

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

Implicación de p110 δ PI3K en la distribución de las células
estromales de los órganos linfoides secundarios y de p110 γ
PI3K en la proliferación de los macrófagos en las lesiones
ateroscleróticas

Teresa María Zotes Ciprés

Madrid, Febrero de 2013

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología, bajo la dirección del Dr. Domingo F. Barber Castaño.

A Jaco y a Alejandra.

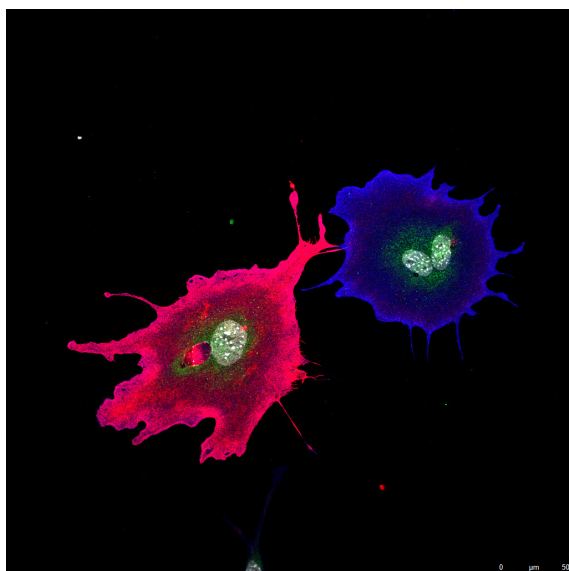
A mi madre y a mi padre.

A Jara, a Javi y a Helena.

Es la posibilidad de realizar un sueño lo que hace que la vida sea interesante.

Paulo Coelho

ÍNDICE



ABREVIATURAS.....	13
SUMMARY.....	21
INTRODUCCIÓN.....	25
Fosfatidilinositol 3-quinasas.....	27
p110 δ	
p110 γ	
Estructura, función y organogénesis del bazo y de los nódulos linfáticos....	31
El bazo: estructura y función	
Los nódulos linfáticos: estructura y función.	
Organogénesis de los órganos linfoides secundarios	
Las células estromales de los órganos linfoides secundarios.....	34
Tipos de células estromales	
Papel de las células estromales de los órganos linfoides secundarios en la respuesta inmune	
La aterosclerosis como patología inflamatoria.....	36
Quimioquinas y receptores de quimioquinas en la aterosclerosis	
Los macrófagos en la aterosclerosis.....	38
Polarización de los macrófagos hacia los fenotipos M1 y M2	
Proliferación de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas	
Papel de p110 γ en la aterosclerosis.....	40
OBJETIVOS.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
RESULTADOS.....	67
Implicación de p110 δ en la distribución de las células estromales de los órganos linfoides secundarios.....	69
Estudio de la distribución de las células del sistema inmune en la zona marginal del bazo de los ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$	

Ensayos de reconstitución con médula ósea en homeostasis y tras estimulación antigénica

Análisis de las poblaciones linfoides mediante inmunofluorescencia y medida de los folículos linfoides del bazo

Estudio del número total de células de los órganos linfoides secundarios y de la respuesta tipo T CD4⁺ a *C. albicans* inactivada por calor

Estudio del número total de células T de memoria en los órganos linfoides secundarios de los ratones p110δ^{WT/WT} y p110δ^{D910A/D910A}

Estudio del número total de células B y de células B de la zona marginal del bazo de los ratones p110δ^{WT/WT} y p110δ^{D910A/D910A}

Análisis de las poblaciones específicas de células estromales de los órganos linfoides secundarios de los ratones p110δ^{WT/WT} y p110δ^{D910A/D910A}

Estudio de la expresión de p110δ en las células estromales de bazo y nódulos linfáticos

Análisis mediante qRT-PCR de la expresión de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento en los órganos linfoides secundarios de los ratones p110δ^{WT/WT} y p110δ^{D910A/D910A}

Implicación de PI3K p110γ en la proliferación de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas.....85

La falta de p110γ en los ratones LDLR^{-/-} reduce el tamaño de las lesiones ateroscleróticas pero no afecta a la captación de LDL acetilado por los macrófagos

La falta de p110γ en ratones LDLR^{-/-} afecta a la infiltración celular en las placas de ateroma

La ausencia de p110γ no afecta a la expresión de CXCR3 en extractos de RNA de cayado aórtico ni en las células T CD4⁺ y CD8⁺

La ausencia de p110γ no afecta a la expresión de CCR2, CCR5 ni CX₃CR1 en extractos de RNA de cayado aórtico y de aorta torácica descendente

Estudio de las poblaciones circulantes en sangre periférica de los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} tras la administración de dieta rica en grasa

La deficiencia en p110γ PI3K provoca la disminución de la proliferación de los macrófagos pero no así la de las células T en las lesiones ateroscleróticas

La apoptosis en las lesiones no se ve afectada por la deficiencia en p110 γ

Los niveles elevados de AMP cíclico se relacionan con la menor proliferación de los macrófagos en los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-}

La deficiencia en p110 γ no afecta a la polarización de los macrófagos hacia los fenotipos M1 y M2

DISCUSIÓN.....101

Implicación de p110 δ en la distribución de las células estromales de los órganos linfoides secundarios.....103

Implicación de PI3K p110 γ en la proliferación de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas.....108

CONCLUSIONES.....115

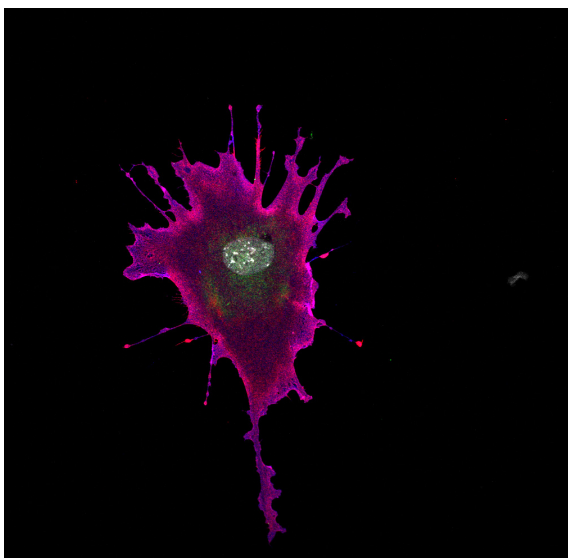
BIBLIOGRAFÍA.....119

ANEXO.....141

AGRADECIMIENTOS.....229

Como no sabían que era imposible lo hicieron.

Anónimo



ABREVIATURAS

ABD: Dominio de unión a la proteína adaptadora

AMP: Adenosina mono-fosfato

APC: Células presentadoras de antígenos

ApoE: Apolipoproteína E

AU: Unidades arbitrarias

BEC: Células del endotelio vascular (*Blood endothelial cells*), también llamadas VEC

BMM: Macrófagos derivados de la médula ósea

BSA: Albúmina de suero bovino

C2: Dominio de unión a fosfolípidos de membrana

cAMP: Adenosina cíclica monofosfato

CCL19: Ligando-19, quimioquina de tipo CC-

CCL2: Ligando-2, quimioquina de tipo CC-

CCL21: Ligando-21, quimioquina de tipo CC-

CCL3: Ligando-3, quimioquina de tipo CC-

CCL5: Ligando-5, quimioquina de tipo CC-

CCR2: Receptor-2 de quimioquinas de tipo CC-

CCR5: Receptor-5 de quimioquinas de tipo CC-

CCR7: Receptor-7 de quimioquinas de tipo CC-

CD11b: Cúmulo (*cluster*) de diferenciación-11b

CD11c: Cúmulo (*cluster*) de diferenciación-11c

CD21: Cúmulo (*cluster*) de diferenciación-21

CD23: Cúmulo (*cluster*) de diferenciación-23

CD3: Cúmulo (*cluster*) de diferenciación-3

CD30L: Ligando del cúmulo (*cluster*) de diferenciación-30

CD31: Cúmulo (*cluster*) de diferenciación-31

CD36: Cúmulo (*cluster*) de diferenciación-36

CD4: Cúmulo (*cluster*) de diferenciación-4

CD44: Cúmulo (*cluster*) de diferenciación-44

CD45: Cúmulo (*cluster*) de diferenciación-45

CD62L: Ligando del cúmulo (*cluster*) de diferenciación-62 o Selectina-L

CD8: Cúmulo (*cluster*) de diferenciación-8

cDNA: DNA complementario

CO₂: Dióxido de carbono

CoCl₂: Cloruro de cobalto

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta del cAMP

CX₃CL1: Ligando-1, quimioquina de tipo CX₃C-

CX₃CR1: Receptor-1 de quimioquinas de tipo CX₃C-

CXCL10: Ligando-10, quimioquina de tipo CXC-

CXCL11: Ligando-11, quimioquina de tipo CXC-

CXCL12: Ligando-12, quimioquina de tipo CXC-

CXCL13: Ligando-13, quimioquina de tipo CXC-

CXCL9: Ligando-9, quimioquina de tipo CXC-

CXCR3: Receptor-3 de quimioquinas de tipo CXC-

CXCR5: Receptor-5 de quimioquinas de tipo CXC-

DC: Células dendríticas

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxiribonucleico

dUTP: Deoxiuridina trifosfato

ECL: Quimioluminiscencia estimulada

EDTA: Ácido etilen-diaminotetraacético

ER-TR7: Marcador de fibroblastos y de fibras reticulares

F4/80: Marcador de macrófagos murinos

FACS: Clasificación de células teñidas mediante inmunofluorescencia

FBS: Suero fetal bovino

FCS: Suero de ternera fetal

FDC: Células foliculares dendríticas

Foxp3: *Forkhead box P3*, factor de transcripción implicado en función de las Tregs

FRC: Células reticulares fibroblásticas

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

gp38: Glicoproteína 38 (podoplanina)

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

Gr1: Marcador celular de granulocitos

HCl: Ácido clorhídrico

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HEV: Vénulas del endotelio alto

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular-1

IFN γ : Interferón gamma

IgD: Inmunoglobulina D

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL-10: Interleuquina-10

IL-12: Interleuquina-12

IL-4: Interleuquina-4

IL-6: Interleuquina-6

iNOS: Sintasa del óxido nítrico inducible

iSH₂: Dominio superenrollado de la subunidad reguladora de clase I_A de PI3K

Ki67: Marcador de proliferación celular

LCMV: Virus de la coriomeningitis linfocítica

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LDLac: Lipoproteínas de baja densidad acetiladas

LDLmod: Lipoproteínas de baja densidad modificadas

LDLox: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas

LDLR: Receptor de LDL

LEC: Células endoteliales linfáticas

LN: Nódulos linfáticos

LPS: Lipopolisacáridos

LT_α: Linfotoxina alpha

LT_α1β2: Linfotoxina alpha-1 beta-2

LT_β: Linfotoxina beta

LT_βR: Receptor de la LT_β

LTi: Células inductoras del tejido linfoide

LTo: Células organizadoras del tejido linfoide

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

M-CSFR: Receptor del M-CSF

Mac-3: Marcador de macrófagos también conocido como Lamp-2

MAdCAM-1: Molécula de adhesión a la adresina de la mucosa celular-1

MEM: Medio Eagle modificado

MMM: Macrófagos metalofílicos de zona marginal

MOMA-1: Marcador de macrófagos metalofílicos (Siglec-1)

MRC: Células reticulares de la zona marginal

mRNA: RNA mensajero

MZ: Zona marginal

MZB: Células B de la zona marginal

MZM: Macrófagos de la zona marginal

NaCl: Cloruro sódico

NaN₃: Azida sódica

NK: Células asesinas naturales (*Natural Killer*)

NO: Óxido nítrico

NOS2: Gen de la sintasa 2 del óxido nítrico

OH: Grupo hidroxilo

OX40L: Ligando del cúmulo (*cluster*) de diferenciación-134

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDE3B: Fosfodiesterasa-3B

PFA: Paraformaldehído	SHIP-1: Fosfatasa-1 de inositol que contiene dominios SH ₂
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa	SHIP-2: Fosfatasa-2 de inositol que contiene dominios SH ₂
PI-3-P: Fosfatidilinositol-3-fosfato	SIGNR1: Gen-1 relativo a SIGN o ER-TR9, marcador de macrófagos de la zona marginal
PI-3, 4-P₂: Fosfatidilinositol-3, 4-bifosfato	SLO: Órganos linfoides secundarios
PI-4-P: Fosfatidilinositol-4-fosfato	SRA: Receptor de barrido (<i>scavenger</i>) de clase A
PI-4, 5-P₂: Fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato	TBS: Tampón Tris salino
PI: Fosfatidilinositol	TCR: Receptor de la célula T
PY: Yoduro de propidio	TdT: Desoxinucleotidil-transferasa terminal
PIK: Dominio helicoidal implicado en la interacción proteína-proteína	Tfh: Células T colaboradoras foliculares
PIP₃: Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato	Th: Células T colaboradoras
PKA: Proteína quinasa A	Th1: Células T colaboradoras de tipo 1
PTEN: Fosfatasa homóloga de tensina	Th17: Células T colaboradoras de tipo 17
qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real	Th2: Células T colaboradoras de tipo 2
RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B	TKR: Receptores ligados a actividad tirosina-quinasa
RBD: Dominio de unión a Ras	TNF: Factor de necrosis tumoral
RNA: Ácido ribonucleico	TNFα: Factor de necrosis tumoral alpha
RPF: Fibroblastos de la pulpa roja	Tregs: Células T reguladoras
RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute	TUNEL: Marcaje de extremos rotos de DNA mediante el uso de la desoxinucleotidil-transferasa terminal
RT: Temperatura ambiente	VCAM-1: Molécula-1 de adhesión a las células vasculares
SD: Desviación estándar	
SDS-PAGE: Electroforesis de geles de poliacrilamida en presencia de SDS	
SDS: Dodecilsulfato sódico	

VEC: Células del endotelio vascular, también llamadas BEC.

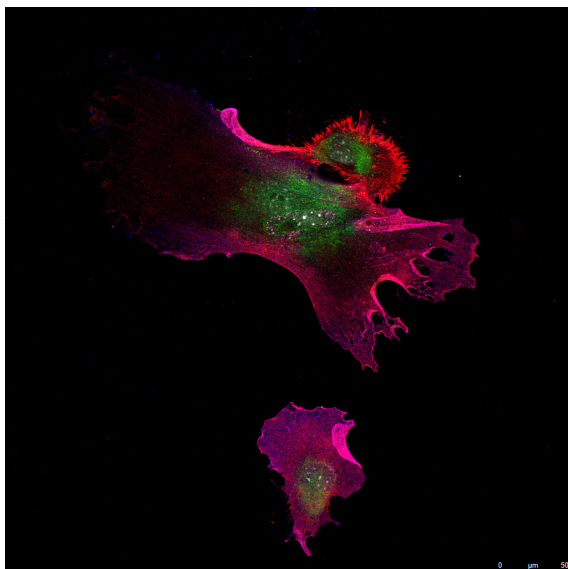
WT: Ratones control con fenotipo salvaje (*wild type*)

YM1: Proteína secretada por macrófagos activados, usada como marcador de macrófagos de tipo M2

YPD: Extracto de levaduras peptona/dextrosa

En el pensamiento científico siempre están presentes elementos de poesía. La ciencia y la música actual exigen de un proceso de pensamiento homogéneo.

Albert Einstein (1879-1955)



SUMMARY

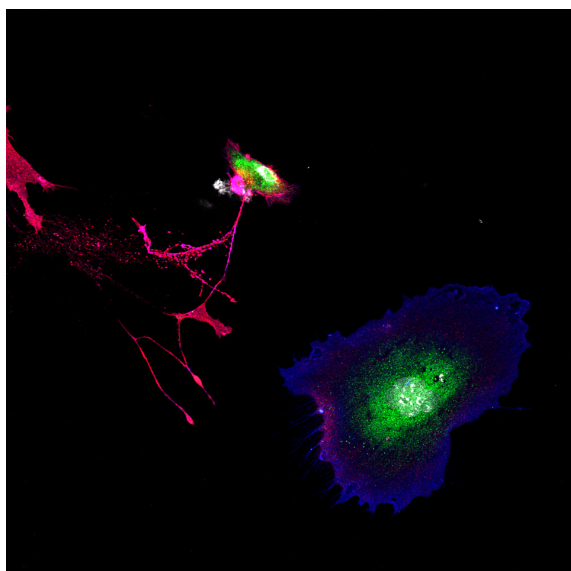
Class I phosphoinositide 3-kinases (PI3K) are a family of enzymes that, after stimulation of protein tyrosine kinase-associated receptors or activation of G protein-coupled receptors (GPCR), generate phosphorylated polyphosphoinositides at cell membranes. This class I of PI3K is constituted of heterodimers formed by a catalytic and a regulatory subunit and comprises class I_A and class I_B. After activation, PI3K generate phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate (PIP₃), a second messenger involved in many cellular processes such as proliferation, migration, differentiation and survival. We studied the specific role of two PI3K catalytic subunits, p110 δ (a member of class I_A PI3K) and p110 γ (a class I_B PI3K) in immune function, specifically in stromal cells from secondary lymphoid organs for p110 δ , and in atherosclerosis as an inflammatory process for p110 γ .

In the first part of this study, we analyzed the implication of p110 δ catalytic activity in immune and stromal cell distribution in secondary lymphoid organs, focusing on spleen, where the structural defects are more evident. We also studied p110 δ expression in secondary lymphoid organ stromal cell population. We show that the lack of p110 δ catalytic activity lead to severe disruption of T cell zone stromal cell distribution and secondary lymphoid organ integrity, which is most pronounced in spleen. We also report p110 δ expression in spleen and lymph node gp38⁺ stromal cell populations.

In the second part of the study, we analyzed p110 γ function in atherosclerosis development, centering on its importance for apoptosis and macrophage proliferation and polarization in lesions, which contribute to lesion maintenance and progression. We show that lack of p110 γ causes a reduction in macrophage proliferation in lesions, probably through a mechanism involving defective cyclic AMP degradation, which lead to cell cycle arrest in macrophages. Nonetheless, we did not find a role for p110 γ in T cell proliferation in lesions, in apoptosis or in macrophage polarization to M1 and M2 phenotypes.

Si no conozco una cosa, la investigaré.

Louis Pasteur (1822-1895)



INTRODUCCIÓN

Fosfatidilinositol 3-quinasas

Las fosfatidilinositol 3-quinasas (PI3K) forman una familia de proteínas quinasa encargadas de fosforilar en posición 3'OH el anillo de inositol de los fosfoinosítidos (PI), generando fosfatidilinositol-3-fosfato (PI-3-P), fosfatidilinositol-3, 4-bifosfato (PI-3, 4-P₂) y, mayoritariamente, fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP₃) (Vanhaesebroeck et al., 2010) (Figura I1). La fosfatasa PTEN degrada PIP₃ en fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato (PI-4, 5-P₂) y las 5-fosfatasas como SHIP-1 o SHIP-2 catalizan la degradación del PIP₃ en PI-3, 4-P₂ o bien la transformación de PI-4, 5-P₂ en fosfatidilinositol-4-fosfato (PI-4-P), actuando como reguladores negativos de la vía de PI3K (Dyson et al., 2012). Existen tres clases de PI3K, separadas en función de su especificidad de sustrato y de sus diferencias estructurales.

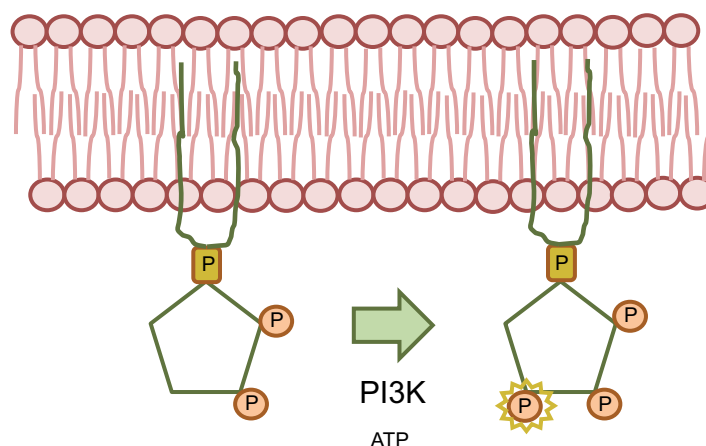


Figura I1: Actividad PI3K. Esquema de la actividad lípido quinasa de PI3K que permite la formación mayoritaria *in vivo* de PIP₃ a partir de PI-4, 5-P₂ en la membrana celular mediante la fosforilación en la posición 3'OH de los fosfoinosítidos.

Las PI3K de clase I son heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica y una reguladora. Se clasifican en Clase I_A o I_B en función de la subunidad reguladora que unen. Las PI3K de clase I_A son heterodímeros formados, en mamíferos, por una subunidad catalítica (p110 α , p110 β o p110 δ) y una subunidad reguladora (p85 α , p85 β , p55 α , p50 α o p50 γ) (So & Fruman, 2012) (Figura I2). Las subunidades catalíticas de clase I_A contienen cinco dominios conservados: el dominio de unión a la proteína adaptadora (ABD), el dominio de unión a Ras (RBD), el dominio de unión a fosfolípidos de membrana (C2), el dominio helicoidal implicado en la interacción proteína-proteína (PIK) y el dominio catalítico quinasa (So & Fruman, 2012). Las subunidades reguladoras de clase I_A PI3K surgen del procesamiento alternativo de tres genes (*PIK3r1*, *PIK3r2* y *PIK3r3*) (Fruman et al., 1996) y comparten entre ellas la mitad C-terminal compuesta de un dominio superenrollado (iSH₂), o de unión al dominio ABD de la subunidad catalítica, flanqueado por dos motivos SH₂ (So & Fruman, 2012). La clase I_B se compone de heterodímeros formados por la subunidad catalítica p110 γ asociada a la subunidad reguladora p101 o a p84/87^{PIKAP} (Stephens et al., 1997; Voigt et al., 2005; Voigt et al., 2006). p110 γ comparte

los dominios ABD, RBD, C2, PIK y el dominio catalítico quinasa con las subunidades catalíticas de la clase I_A (So & Fruman, 2012). Las subunidades reguladoras de clase I_B están menos estudiadas y constan de dos dominios fundamentales, uno de unión a la subunidad catalítica y otro de unión a las subunidades βγ de las proteínas G (So & Fruman, 2012) (Figura I2).

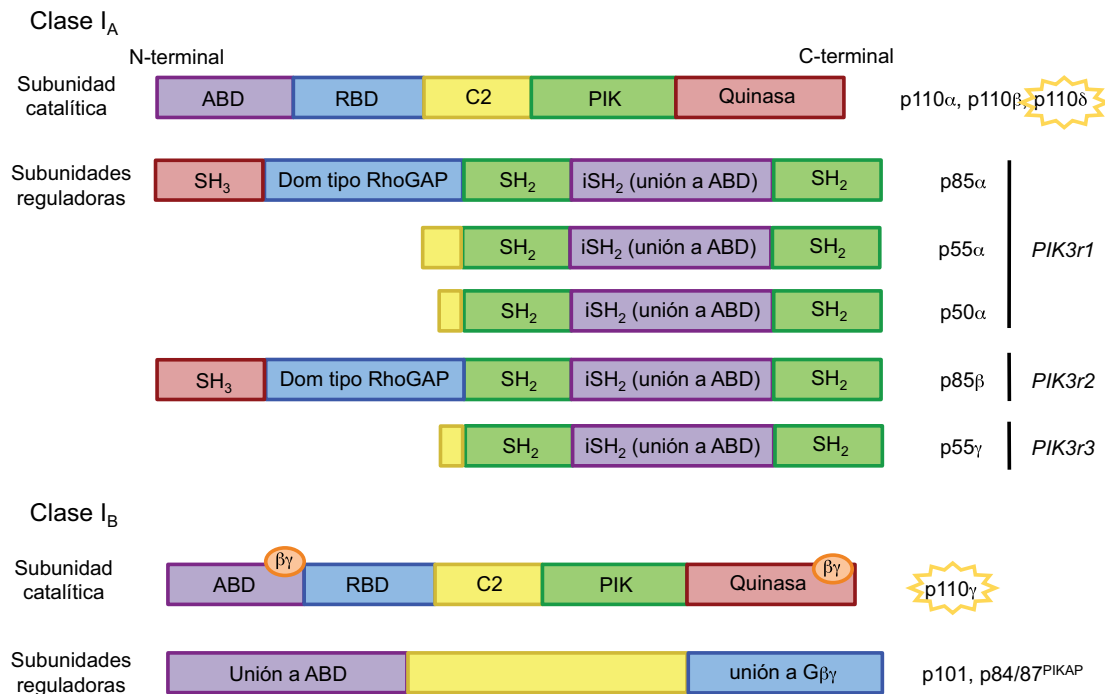


Figura I2: Subunidades de Clase I PI3K. Las subunidades catalíticas de clase I PI3K poseen cinco dominios fundamentales: el dominio de unión a la subunidad reguladora (ABD), el dominio de unión a Ras (RBD), el dominio C2, el dominio helicoidal PIK y el dominio catalítico quinasa. p110γ, la subunidad catalítica de clase I_B PI3K, posee además dos sitios de unión a las subunidades βγ de las proteínas G heterotriméricas. Las subunidades reguladoras de clase I_A PI3K comparten dos dominios de tipo SH₂ que flanquean al dominio iSH₂ o dominio de unión a la subunidad catalítica. Las subunidades reguladoras de clase I_B poseen un dominio de unión a la subunidad catalítica y un dominio de unión a las subunidades βγ de las proteínas G heterotriméricas.

Las PI3K de Clase I son activadas por un gran número de receptores de superficie celular como los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) o los receptores ligados a la actividad tirosina-quinasa (TKR). Se trata de receptores que responden a la activación mediante diversos estímulos, como factores de crecimiento, mediadores inflamatorios, hormonas, antígenos, neurotransmisores o inmunoglobulinas, entre otros. El PIP₃ que genera la actividad PI3K es un segundo mensajero que transduce estos estímulos extracelulares hacia en interior de la célula (So & Fruman, 2012). En general, se pensaba que las PI3K de clase I_A se activaban a través de TKR (Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2003; Fruman, 2004) mientras que las de clase I_B lo hacían a través de GPCR (Stephens et al., 1997). Sin embargo, hay estudios que conectan la actividad de p110β y p110δ a

los GPCR (Guillermet-Guibert et al., 2008; Saudemont et al., 2009) y la de p110 γ con los TKR (Alcazar et al., 2007; Schmid et al., 2011). Estos datos demuestran que la relación entre el receptor activador y la isoforma de PI3K no está tan compartimentalizada como se creía.

Las PI3K de clase II son enzimas capaces de fosforilar PI y PI-4-P *in vitro*. Se localizan fundamentalmente asociadas a membranas intracelulares, presentando niveles muy bajos en el citosol y en el núcleo. En mamíferos, existen tres isoformas: PIK-C2 α , PIK-C2 β y PIK-C2 γ . Sin embargo, no se conocen subunidades reguladoras para estas PI3K. Estudios con células de mamíferos han implicado a estas PI3K de clase II en procesos biológicos como la migración celular, el metabolismo de la glucosa, la exocitosis, la contracción del músculo liso o la apoptosis (Vanhaesebroeck et al., 2010).

Las PI3K de clase III comprenden un único miembro, Vps34, que forma un heterodímero constitutivo con Vps15 y se asocia con complejos multiproteicos. Es capaz de fosforilar únicamente PI para generar PI-3-P. En levaduras (Vps34p) desempeña un papel fundamental en el tráfico vesicular de proteínas de nueva síntesis, y en mamíferos también se ha relacionado con la regulación del tráfico vesicular (autofagia, endocitosis y fagocitosis) (Vanhaesebroeck et al., 2010).

La activación de las PI3K promueve la proliferación, la migración, la diferenciación o la supervivencia de muchos tipos celulares inmunes, y su supresión puede atenuar la respuesta inmune o bien promover la inflamación. Por ello, se han desarrollado numerosos inhibidores de PI3K para tratar enfermedades autoinmunes e inflamatorias (So & Fruman, 2012).

p110 δ

p110 δ es una subunidad catalítica de la clase I $_A$ de PI3K, junto con p110 α y p110 β . p110 δ comparte el dominio catalítico con el resto de PI3K y se une a una subunidad reguladora (p85 α , p85 β , p55 α , p50 α o p50 γ). p110 δ se expresa preferentemente en leucocitos, mientras que p110 α y p110 β son ubicuas (So & Fruman, 2012). Sin embargo, p110 δ se expresa también en neuronas (Eickholt et al., 2007), en algunas líneas celulares de cáncer (Sawyer et al., 2003) y en líneas celulares endoteliales (Geng et al., 2004; Puri et al., 2004). p110 δ tiene un papel central en las células inmunes, en procesos como la diferenciación, la activación y el desarrollo de las células B y T (Puri & Gold, 2012; Okkenhaug et al., 2002; Clayton et al., 2002; Jou et al., 2002; Rolf et al., 2010), de las células T reguladoras (Tregs) (Patton et al., 2006), de los macrófagos (Papakonstanti et al., 2008) y de los mastocitos (Okkenhaug et al., 2007). Las células B de la zona marginal (MZB) del bazo se ven drásticamente reducidas en ausencia de actividad catalítica p110 δ (Durand et al., 2009).

p110 δ es esencial también en la elaboración de una respuesta inmune correcta, tanto primaria como secundaria o de memoria (Clayton et al., 2002; Jou et al., 2002; Rolf et

al., 2010; Liu et al., 2009; Liu & Uzonna, 2010). Las células T CD4⁺ en estado estacionario recirculan a través de los tejidos linfoides, en busca de péptidos antigénicos presentados por las células presentadoras de antígenos (APC). Tras el reconocimiento antigénico y la coestimulación gracias a las células dendríticas (DC), se produce la expansión clonal de las células T y la diferenciación hacia células T CD4⁺ efectoras. Estas células reciben el nombre de células T colaboradoras (Th), ya que ayudan a otras células inmunes (células B, macrófagos, células T CD8⁺, etc) en la elaboración de la respuesta inmune. Las células Th incluyen varios subtipos: Th1, Th2, Th17 y células T colaboradoras foliculares (Tfh), según el patrón de citoquinas que secretan y su función en la respuesta inmune. p110 δ está implicada en la diferenciación y/o correcta funcionalidad de todos estos tipos de células Th (Okkenhaug et al., 2006; Haylock-Jacobs et al., 2011; Rolf et al., 2010).

Algunas de estas células T activadas con la primera inmunización darán lugar a las células T de memoria, proporcionando, de este modo, una defensa inmediata ante una segunda inmunización y la capacidad de elaborar una respuesta inmune secundaria efectiva. Tradicionalmente, se pensaba que las células T de memoria eran supervivientes de las células T efectoras que permanecían en un estado de quiescencia hasta el segundo encuentro con el antígeno. Sin embargo, se sabe que existe heterogeneidad entre las células T de memoria, existiendo por lo menos dos tipos: las células T de memoria central (CD44^{alto}CD62L^{alto}), capaces de proliferar y dar lugar a células efectoras tras un segundo encuentro con el antígeno; y las células T de memoria efectoras (CD44^{alto}CD62L^{bajo}), capaces de migrar a los tejidos inflamados y combatir la infección (Sallusto & Lanzavecchia, 2001; Liu and Uzonna, 2010). Se ha descrito que en los ratones p110 δ ^{D910A/D910A} se hallan afectadas ambas poblaciones de células T CD4⁺ de memoria tras la reinfección con *Leishmania major* (Liu & Uzonna, 2010).

Por otro lado, se sabe que p110 δ está implicada en la secreción de citoquinas en diferentes tipos celulares. De este modo, en los macrófagos, la ausencia de actividad catalítica p110 δ provoca una menor secreción de TNF α (Low et al., 2010), en los mastocitos, una menor secreción de IL-6 y de TNF α (Ali et al., 2004); y en las células B, una menor secreción de IL-6 e IL-10 (Dil & Marshall, 2009). También, las células NK activadas de los ratones deficientes en p110 δ secretan menos IFN γ , TNF α y GM-CSF (Kim et al., 2007). Este papel de p110 δ en la secreción celular está relacionado con su implicación en el tráfico vesicular y con su localización en el aparato de Golgi descrita en líneas celulares de macrófagos (Low et al., 2010).

p110 γ

p110 γ es la subunidad catalítica de clase I β de PI3K y se asocia bien a la subunidad reguladora p101 o bien a p84/87^{PIKAP} (Stephens et al., 1997; Voigt et al., 2005; Voigt et al., 2006). p110 γ se expresa preferentemente en las células hematopoyéticas; sin embargo, también se encuentra a bajas concentraciones en las células endoteliales, en las células del músculo liso y en los cardiomiocitos (Oudit et al., 2004).

p110 γ participa en el desarrollo y en la funcionalidad de diferentes tipos de células hematopoyéticas. Más concretamente, p110 γ está implicada en la funcionalidad de los neutrófilos así como en la migración de los neutrófilos y de los macrófagos a los focos inflamatorios (Sasaki et al., 2000; Li et al., 2000; Hirsch et al., 2000; Randis et al., 2008). Además, la degranulación de los mastocitos se ve reducida en ausencia de p110 γ (Vanhaesebroeck et al., 2005). Esta isoforma de PI3K es necesaria también para desarrollo y la funcionalidad de las células NK (Tassi et al., 2007), para su migración y quimiotaxis hacia gradientes de las quimioquinas CXCL12 y CCL3 (Saudemont et al., 2009). En las células T, p110 γ controla su diferenciación (Sasaki et al., 2000; Rodríguez-Borlado et al., 2003; Janas & Turner, 2011) y la supervivencia de las células T de memoria (Barber et al., 2005; Barber et al., 2006). Además, p110 γ participa en la función de las células T inmunocompetentes, a través de su papel fundamental en la activación de dichas células a través del TCR (Sasaki et al., 2000; Alcazar et al., 2007). También, p110 γ regula la migración de las células T CD4⁺ y CD8⁺ efectoras a los sitios de inflamación (Thomas et al., 2008; Martin et al., 2008).

Estructura, función y organogénesis del bazo y de los nódulos linfáticos

El bazo: estructura y función

El bazo filtra la sangre de eritrocitos dañados, y permite la supervivencia de los patógenos que penetran vía sanguínea así como la llegada de antígenos grandes (Mebius & Kraal, 2005). El bazo está dividido en dos áreas bien definidas, la pulpa roja y la pulpa blanca (que posee una alta actividad inmunológica). Ambas aparecen separadas por la zona marginal (MZ) (Figura I3). En la pulpa roja se lleva a cabo la filtración de los eritrocitos dañados de la sangre, que quedan retenidos y son fagocitados por los macrófagos de la pulpa roja, así como el reciclaje del hierro. La pulpa blanca consta de las áreas de linfocitos B y T, que aparecen separadas, así como del “sistema de conductos” (conduit system) formado por las células reticulares fibroblásticas (FRC), que permiten la migración de los antígenos pequeños a las áreas B y T (Mebius & Kraal, 2005). La zona T contiene principalmente linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ así como algunos subtipos de DC. La zona B contiene células B y células foliculares dendríticas (FDC) como soporte estromal (Mueller & Germain, 2009). La zona marginal separa la pulpa blanca de la roja y contiene principalmente macrófagos con actividad fagocítica (macrófagos metalofílicos de zona marginal (MMM) y macrófagos de zona marginal (MZM)), MZB y DC (Mebius & Kraal, 2005; Mueller & Germain, 2009) (Figura I3). Allí tiene lugar la captura de antígenos y, por lo tanto, comienza la respuesta inmune. Las APC de la MZ presentan antígenos llegados por vía sanguínea de manera directa a las células T de la pulpa blanca. En el bazo, las células del sistema inmune y los antígenos particulados penetran a través de vasos sanguíneos (arteriolas centrales), que desembocan en la pulpa roja y en la zona marginal (Mebius & Kraal, 2005). Muchos linfocitos salen del bazo a través de las venas esplénicas, y el resto a través de los canales-puente de la zona marginal (región donde la

zona T se encuentra con la zona marginal) (Mitchell, 1973). No está muy clara la forma en que los linfocitos dejan la pulpa blanca, podrían hacerlo a través de un sistema de vasos linfáticos eferentes localizados alrededor de la arteriola central (Pellas & Weiss, 1990).

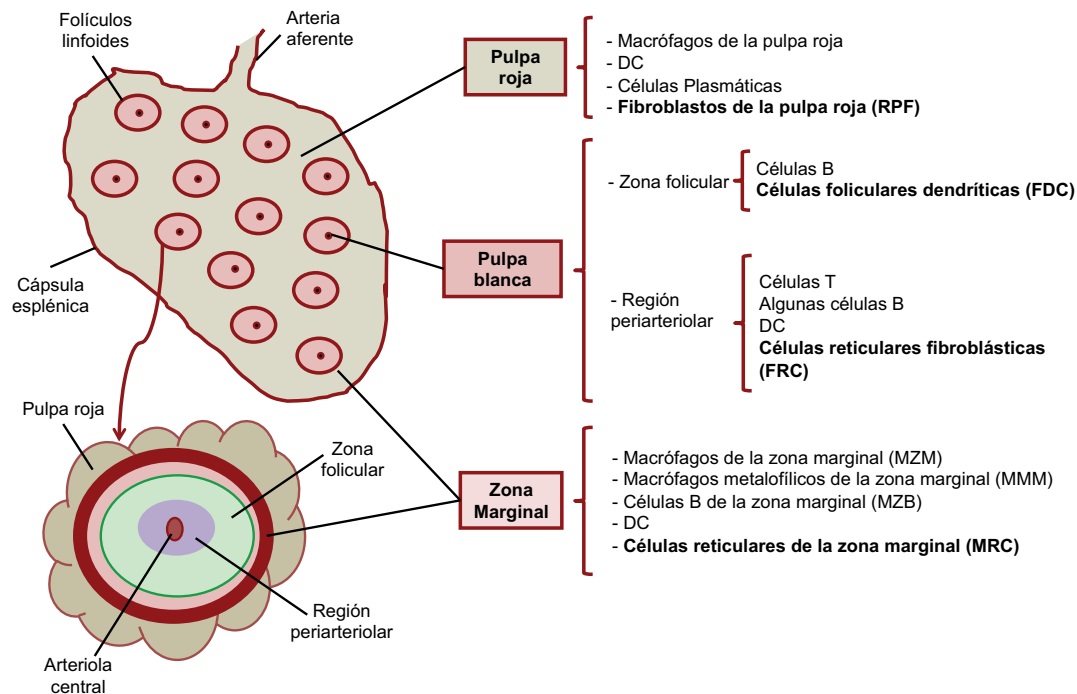


Figura I3: Estructura del bazo y localización de los principales tipos celulares linfoides y estromales.

El bazo es un órgano linfóide secundario que se divide en dos regiones fundamentales, la pulpa roja y la pulpa blanca, separadas por la zona marginal. En la pulpa roja aparecen diferentes tipos celulares, como los macrófagos de la pulpa roja, encargados de fagocitar los eritrocitos dañados. Estas células encuentran soporte en los fibroblastos de la pulpa roja. La pulpa blanca comprende la zona de células B o folicular, con las células foliculares dendríticas como soporte estructural para las células B, y la zona periarteriolar, que rodea a la arteriola central del folículo, que está formada principalmente por células T y DC, sobre un soporte estructural de células reticulares fibroblásticas. La zona marginal contiene macrófagos como los MMM y los MZM, así como células B y DC, en un soporte de células reticulares marginales.

Los nódulos linfáticos: estructura y función

Los nódulos linfáticos (LN) son órganos linfoides encapsulados que reciben linfa procedente del filtrado del fluido extracelular de los órganos y tejidos del cuerpo a través de los vasos linfáticos aferentes. Bajo la cápsula contienen el seno subcapsular, en el que desembocan dichos vasos linfáticos, los cuales transportan antígenos, microorganismos y células como los linfocitos y las APC. Esta zona contiene principalmente macrófagos encargados de capturar los antígenos y de presentarlos a los linfocitos (Mueller & Germain, 2009). En los LN, los linfocitos *naïve* se extravasan del torrente sanguíneo a través de las vénulas del endotelio alto (HEV) (vasculatura compartida por el sistema sanguíneo y

el linfático). Las HEV están rodeadas por las áreas de células B y T, y se abren a la zona cortical de los LN. Las zonas de células B y T de los LN son muy similares en estructura y composición celular a las del bazo (Mueller & Germain, 2009). A diferencia de lo que ocurre en el bazo, las APC migran desde los tejidos periféricos hasta los LN, donde activan a las células T (revisado en Tan & Watanabe, 2010) (Figura I4).

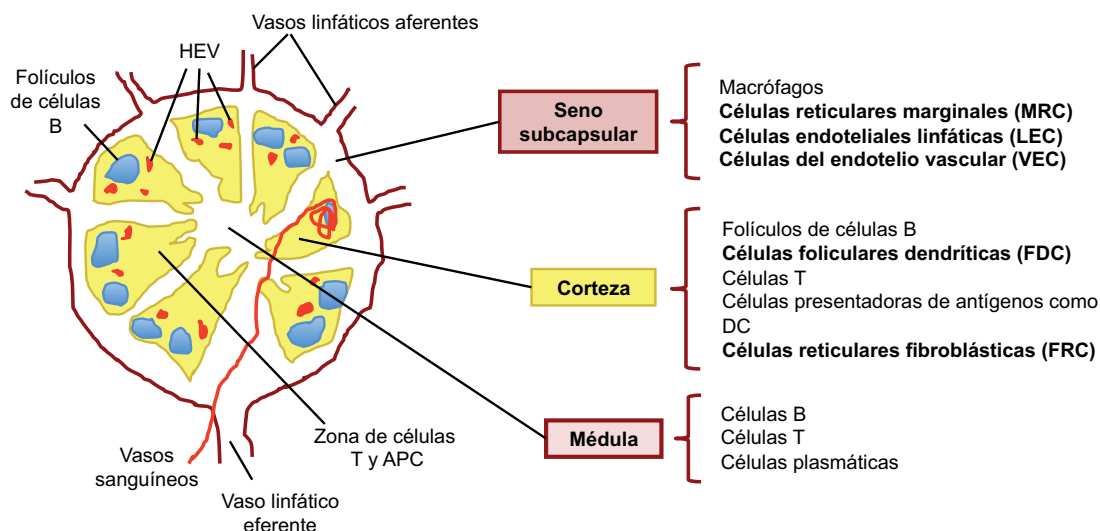


Figura I4: Estructura de los nódulos linfáticos y localización de los principales tipos celulares linfoides y estromales. Los nódulos linfáticos están divididos en tres regiones fundamentales: el seno subcapsular, la corteza y la médula. A través del seno subcapsular entran los vasos linfáticos aferentes, que transportan antígenos, moléculas, microorganismos y células procedentes de la linfa. En esta zona existen macrófagos que capturan esos antígenos y también están presentes las células reticulares marginales, similares a las del bazo. Los vasos linfáticos aferentes están formados por las células endoteliales linfáticas, subtipo estromal con un papel importante en la elaboración de la respuesta inmune a través de su secreción, entre otras, de la quimioquina CCL21. La corteza contiene, por un lado, los folículos de células B, con las células foliculares dendríticas como soporte y, por otro lado, la región de células T y células presentadoras de antígenos, con las células reticulares fibroblásticas como soporte. Por último, la médula contiene principalmente células B, células T así como células plasmáticas.

Organogénesis de los órganos linfoides secundarios

Los órganos linfoides secundarios (SLO) se desarrollan a partir de un conjunto de agregados mesenquimales y hematopoyéticos que se asocian con los vasos y con el epitelio en un lugar y momento definidos en el feto (Mebius, 2003). La organogénesis embrionaria de los SLO depende de la interacción de dos tipos celulares principales, las células inductoras de tejido linfóide (LTi) y las células organizadoras del tejido linfóide (LTo); estas últimas son células mesenquimales estromales (Mebius et al., 1997; Honda et al., 2001; Kim, 2005). Las LTi expresan $LT\alpha 1\beta 2$, que se une al $LT\beta R$ de las LTo. Esta interacción induce dos cascadas de señalización celular diferentes que implican a $NF\kappa B$

(Dejardin et al., 2002) y tienen como resultado en las LTo la secreción de quimioquinas (CCL19, CCL21 y CXCL13) y la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y MAdCAM-1) (Benezech et al., 2010). Las quimioquinas secretadas por las LTo crean un bucle de retroalimentación positivo entre las células LTi y las LTo, ya que estimulan la expresión de $LT\alpha 1\beta 2$ en las células LTi, que se unirá de nuevo al $LT\beta R$ comenzando el proceso descrito. El gradiente quimiotáctico también contribuye al reclutamiento de las células B y T al primordio en desarrollo. A continuación, las células endoteliales se diferencian para formar las HEV y se produce la segregación de las áreas de células B y T. Existen otras moléculas, además de las ya mencionadas $LT\alpha 1\beta 2$ y $LT\beta R$, que son importantes para los procesos implicados en la organogénesis de los SLO. La linfotoxina α ($LT\alpha$), la linfotoxina β ($LT\beta$) y el ligando del receptor activador del factor nuclear κB (RANKL) regulan de diferentes maneras la formación del bazo y de los LN (Banks et al., 1995; Koni et al., 1997; Kim et al., 2000).

En adultos, la generación de tejido linfoide requiere la presencia de las LTi del bazo, que mantienen la segregación de las células B y T mediante la expresión de $LT\alpha$, $LT\beta$ y del factor de necrosis tumoral α ($TNF\alpha$), necesarios para controlar la estructura de los SLO en los adultos (Kim, 2008). Las LTi de los adultos difieren de las LTi neonatales en que las primeras expresan mayores niveles de OX40L y CD30L, factores que promueven la supervivencia de los linfocitos T $CD4^+$ y que contribuyen igualmente a la generación de la memoria inmunológica (Kim, 2008; Kim et al., 2003; Kim et al., 2005). Las células reticulares marginales (MRC) son las equivalentes a las LTo en adultos (Katakai, 2012) y se localizan bajo el seno subcapsular de los LN o en la MZ del bazo, alrededor de los folículos de células B (Katakai et al., 2008) (Figuras I3 y I4).

Las células estromales de los órganos linfoides secundarios

Tipos de células estromales

La formación de la microarquitectura de los SLO implica la segregación de las células B y las T, que depende de las quimioquinas secretadas por las células estromales no hematopoyéticas entre otras. En condiciones de homeostasis, los folículos primarios de células B contienen FDC, que participan en la organización del compartimento de células B y en la presentación antigénica a dichas células. Las FDC reclutan a las células B mediante la secreción de CXCL13, que se une al receptor CXCR5 expresado por las células B (Cyster et al., 2000). La población de células estromales de tipo FRC forma la red que da estructura a la zona de células T (Katakai et al., 2004); las FRC secretan CCL19 y CCL21, quimioquinas que atraen a las células T y DC que a su vez expresan su receptor CCR7 facilitando así el encuentro con el antígeno (Luther et al., 2000; Gunn et al., 1998b; Gunn et al., 1999). Las FRC forman el sistema de conductos que permite la migración de pequeños antígenos a las zonas de células B y T de los SLO. Los antígenos más grandes son excluidos de estos conductos y atrapados por APC en la zona marginal del bazo o en el seno subcapsular de los LN. Este sistema de conductos

se extiende principalmente a través de la zona de células T aunque también llega a la zona de células B, donde la red que forma es menos densa (Rooszendaal et al., 2009). Las MRC participan, además de su papel ya descrito en la organogénesis de los SLO, en la captura y la liberación de antígenos hacia la zona de células B de los SLO (Katakai, 2012). Son las únicas células estromales que expresan RANKL, miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (Katakai et al., 2008) y secretan, junto con las FDC, la quimioquina CXCL13 (Katakai et al., 2008; Mueller & Ahmed, 2008). Los fibroblastos de la pulpa roja del bazo (RPF) conforman una densa red junto con las fibras reticulares y expresan diferentes cadenas de integrinas que contribuyen a la correcta localización de las células en esta región del bazo (van den Berg et al., 1993). Algunas de esas células son los macrófagos de la pulpa roja, encargados de fagocitar a los eritrocitos dañados y del reciclaje del hierro. Las células endoteliales linfáticas (LEC) forman los vasos linfáticos aferentes a los LN mientras que las células del endotelio vascular (VEC) tapizan los vasos sanguíneos del bazo y las HEV en los LN (Fletcher et al., 2011). Las células ER-TR7⁺ incluyen los subtipos estromales FRC, RPF, MRC y LEC (Mueller & Germain, 2009).

Papel de las células estromales de los órganos linfoides secundarios en la respuesta inmune

Las células estromales de los órganos linfoides secundarios mantienen la organización y la microarquitectura de dichos órganos. La distribución de las células estromales de los SLO facilita la comunicación efectiva entre las APC y los linfocitos, necesaria para la generación de una respuesta inmune correcta frente a determinados agentes patógenos. La infección por ciertos patógenos como los virus de la inmunodeficiencia humana y la simia, el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) o la *Leishmania donovani*, puede llevar a la inmunodeficiencia ya que estos patógenos dañan la microanatomía de los órganos linfoides secundarios y, por lo tanto, su integridad (Mueller & Germain, 2009). En el caso de LCMV, las células T citotóxicas antivirales destruyen las FRC que infectan, haciendo que el huésped sea incapaz de responder a una segunda infección (Scandella et al., 2008).

Las células estromales del bazo y de los LN, como las FRC y las FDC, secretan citoquinas y quimioquinas y expresan moléculas de adhesión que contribuyen a la migración, la homeostasis y la supervivencia de las células del sistema inmune (Luther et al., 2000; Link et al., 2007; Mueller & Ahmed, 2008). Las células estromales también participan en la presentación antigénica, ya que las APC se adhieren a la red que conforma el estroma y los linfocitos se desplazan rodando sobre la superficie de esta red hasta encontrar al antígeno (Mueller & Germain, 2009; Mueller & Ahmed, 2008). Tras el acoplamiento T-DC, las FRC producen sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS). Este iNOS estromal modula la respuesta inmune local ya que limita la agrupación de las células T, así como su proliferación y la progresión del ciclo celular (Khan et al., 2011). De

este modo, las FRC modulan la respuesta T. Además de las FRC, las LEC de los nódulos linfáticos limitan la proliferación de las células T mediante su expresión del gen de la sintasa 2 del óxido nítrico (NOS2) y la producción de óxido nítrico (NO) tras su interacción con las células T activadas (Lukacs-Kornek et al., 2011; Siegert et al., 2011). Las células estromales tienen, por consiguiente, actividad positiva y negativa en la generación de la respuesta inmune mediada por las células T (Siegert & Luther, 2012). Sin embargo, aún queda mucho por aprender en cuanto al papel concreto de las células estromales en la respuesta inmune fisiológica y en la autoinmunidad.

La aterosclerosis como patología inflamatoria

A pesar de que se han hecho algunos progresos en la prevención y en el tratamiento de la aterosclerosis, principalmente modulando el metabolismo del colesterol y de los triglicéridos, sus complicaciones siguen siendo la primera causa de muerte en países desarrollados, y la segunda más frecuente en todo el mundo. La reciente descripción de los mecanismos que regulan la migración de los leucocitos y de su infiltración, así como su proliferación en las lesiones, hace necesarios los intentos para desarrollar tratamientos que regulen esos procesos en la patología de la aterosclerosis.

La aterosclerosis ha sido considerada tradicionalmente como un desorden en el metabolismo del colesterol que provoca la acumulación de lípidos en la pared vascular, causando el engrosamiento de la misma. Comparte características con las enfermedades inflamatorias crónicas, como la infiltración de células inmunes en la pared arterial (Hansson & Libby, 2006; Galkina & Ley, 2009) (Figura I5). De manera temprana en el desarrollo de la enfermedad, las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) que se acumulan en la íntima activan a las células endoteliales, las cuales secretan una serie de moléculas proinflamatorias que reclutan leucocitos específicos en la pared arterial (Lusis, 2000) (Figura I5).

Los monocitos/macrófagos se acumulan preferentemente en la placa aterosclerótica, además de otros componentes como las células T, las células dendríticas, las células B, los mastocitos, los neutrófilos o las plaquetas, que también contribuyen a potenciar la inflamación (Lusis, 2000; Witztum & Palinski, 1999; Weber & Noels, 2011; Swirski & Nahrendorf, 2013) (Figura I5). Las células B, raras en las lesiones, aparecen principalmente en la capa adventicia y pueden promover o dificultar la progresión de la aterosclerosis (Kyaw et al., 2011; Kyaw et al., 2012). Los neutrófilos favorecen el desarrollo de las lesiones ya que contribuyen a la adhesión y a la trans migración de los monocitos (Drechsler et al., 2010). Los mastocitos liberan el contenido de sus gránulos potenciando la inflamación (Sun et al., 2007) y las plaquetas se adhieren al endotelio favoreciendo la entrada de los monocitos, con lo que potencian el desarrollo de las lesiones (Huo et al., 2003). Las DC son muy abundantes en la capa íntima y se ha descrito que algunos subtipos contribuyen a la protección frente a la aterosclerosis (Choi et al., 2011). Las células T son relativamente escasas en las lesiones. No obstante, estudios relacionados

con las citoquinas secretadas por los diferentes subtipos de células T, revelan que las células Th1 y Th17 son aterogénicas mientras que las células Th2 y Tregs protegen frente al desarrollo de la aterosclerosis (Andersson et al., 2010; Lahoute et al., 2011). Las Tregs, que desempeñarían un papel anti-inflamatorio, aparecen en las lesiones en números muy reducidos (de Boer et al., 2007). Además, tras el comienzo de la formación de la lesión aterosclerótica, algunas células de músculo liso de la capa media de las arterias se desplazan hacia la íntima, donde proliferan, contribuyendo a la severidad de la enfermedad (Ross, 1999).

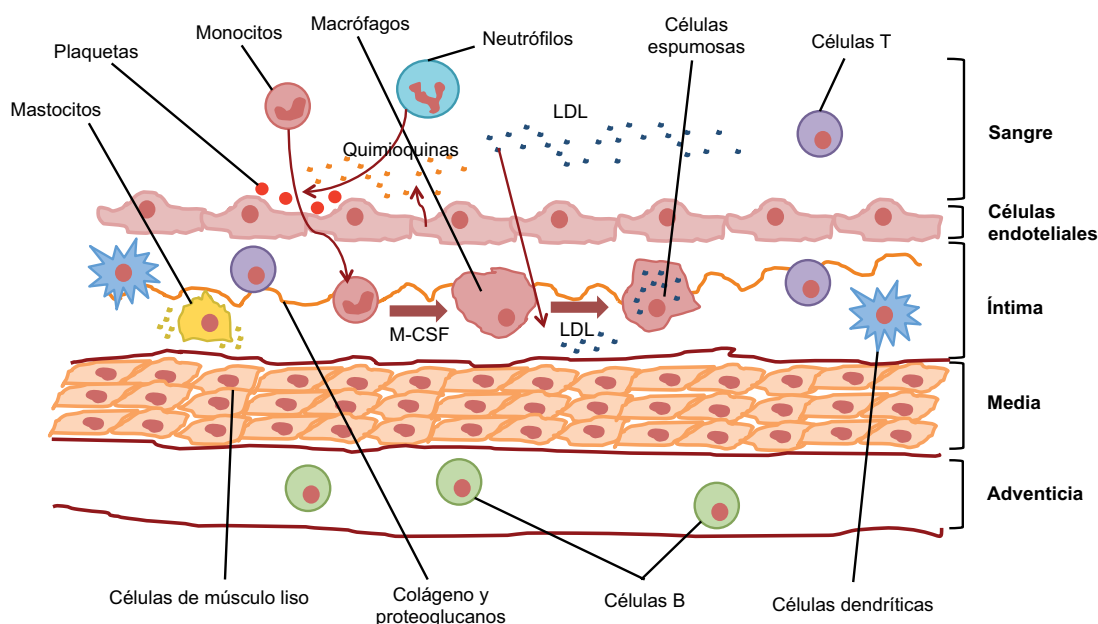


Figura I5: Desarrollo e infiltración celular en la lesión aterosclerótica. Esquema de la formación de una placa de ateroma mediante la infiltración de células inmunes. Los monocitos penetran en la íntima ayudados por la acción de los neutrófilos, de las plaquetas, y atraídos por quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión secretadas y expresadas, respectivamente, por las células endoteliales. Las células B se acumulan preferentemente en la capa adventicia, mientras que el resto de tipos celulares lo hacen mayoritariamente en la íntima. Los monocitos se diferencian a macrófagos en las lesiones por la acción del M-CSF presente en las mismas y acumulan LDL transformándose en células espumosas, que contribuyen a la progresión de la lesión hacia estadios más avanzados, pudiendo desembocar en enfermedad aterotrombótica vascular.

En las lesiones tempranas, la mayoría de los monocitos se diferencian hacia macrófagos debido al efecto del M-CSF así como de otros mediadores de la inmunidad innata y la adquirida (Moore & Tabas, 2011). Los macrófagos que se acumulan en la neoíntima internalizan lipoproteínas para convertirse en células espumosas, que contribuirán a la modificación y a la retención de estas lipoproteínas, exacerbando la progresión de la enfermedad (Witztum & Palinski, 1999; Moore & Tabas, 2011) (Figura I5). La captura de LDL nativo se produce vía macropinocitosis (Yao et al., 2009; Anzinger

et al., 2012), mientras que el LDLmod (como el LDLac), se captura a través de receptores de tipo *scavenger*, como CD36 o el receptor de clase A (SRA) (Kunjathoor et al., 2002; Yao et al., 2009). La activación de los macrófagos y de las células T provoca la liberación de mediadores inflamatorios adicionales, incluyendo citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento (Zernecke et al., 2008). Este entorno de inflamación promueve la progresión de las lesiones tempranas hacia lesiones más complejas, caracterizadas por la aparición de fisuras, hematomas y trombos, que invaden la luz arterial y pueden desembocar en una enfermedad aterotrombótica vascular (Hansson & Libby, 2006; Swirski & Nahrendorf, 2013).

Quimioquinas y receptores de quimioquinas en la aterosclerosis

El reclutamiento de las células del sistema inmune a las placas de ateroma está mediado por una serie de quimioquinas y de receptores para estas quimioquinas cuya secreción y expresión respectivas por parte de las células circulantes y de las presentes en las lesiones influye en gran medida en el desarrollo de las mismas. El receptor de quimioquinas CXCR3 está implicado en la migración de los leucocitos a los focos inflamatorios (Xie et al., 2003). En relación con la aterosclerosis, se ha descrito que el tratamiento con un agonista de CXCR3 atenúa la formación de las placas de ateroma en los ratones LDLR^{-/-} (van Wanrooij et al., 2008). El CCR2 se expresa en los monocitos Ly6C^{alto} o inflamatorios, subtipo más abundante en las lesiones ateroscleróticas, gracias a su mayor capacidad de infiltración en las mismas con respecto a los Ly6C^{bajo} o anti-inflamatorios (Swirski et al., 2007). El receptor CCR5 se expresa en células presentes en las lesiones como son los monocitos/macrófagos y los linfocitos T, y actúa mediando la parada y la diapédesis transendotelial de estos tipos celulares mediante su unión al CCL5 (Jones et al., 2011). CX₃CR1 se expresa en las lesiones en las células endoteliales, en las células espumosas y en las células de músculo liso de las arterias coronarias (Imai et al., 1997; Schulz et al., 2007; Barlic et al., 2007). Además, la delección conjunta de CX₃CR1, CCR2 y CCR5 en ratones ApoE^{-/-} provoca una disminución de la aterosclerosis en un 90% (Combadiere et al., 2008).

Los macrófagos en la aterosclerosis

Polarización de los macrófagos hacia los fenotipos M1 y M2

Los macrófagos constituyen una población heterogénea, capaz de adaptar su fisiología en respuesta a una gran variedad de situaciones que se presentan en su microambiente. Se piensa que hay dos fenotipos principales; los macrófagos activados de manera clásica (M1), que son proinflamatorios, y los macrófagos activados de manera alternativa (M2), que se consideran reparadores y que regulan los procesos inflamatorios (Gordon & Taylor, 2005). Cuando se estimulan los precursores de médula ósea con el GM-CSF, se generan células de fenotipo M1, mientras que la estimulación con M-CSF promueve el fenotipo M2 (Falk & Vogel, 1988; Hamilton, 2008). Los estudios revelan

que existen ambos subtipos de macrófagos en las lesiones ateroscleróticas de ratón y de humano (Johnson & Newby, 2009). Además, se ha descrito el predominio de los macrófagos de tipo M2 infiltrando las lesiones de ratones deficientes en ApoE jóvenes, mientras que los macrófagos de tipo M1 dominan en las lesiones de los ratones deficientes en ApoE más viejos. Los análisis indican que existe una transición de macrófagos con fenotipo M2 hacia M1 en las lesiones ateroscleróticas con la progresión de la enfermedad (Khallou-Laschet et al., 2010).

Proliferación de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas

El número de macrófagos en las lesiones está controlado por la infiltración de los monocitos inflamatorios (Ly6C^{alto}) en las placas de ateroma así como por la apoptosis y por la proliferación local de los macrófagos (Swirski et al., 2007; Antonov et al., 1997; Sakai et al., 2000; Seimon & Tabas, 2009). Los fenómenos de apoptosis resultan algo contradictorios en la progresión de la lesión aterosclerótica. Así, en las lesiones tempranas la apoptosis limita el número total de células de la lesión mientras que en las lesiones avanzadas promueve el desarrollo del núcleo necrótico, factor de riesgo importante para el desarrollo de la trombosis (Seimon & Tabas, 2009). La proliferación de los macrófagos presentes en las lesiones tempranas provoca la progresión de las mismas hacia estadios de mayor complejidad (Antonov et al., 1997; Sakai et al., 2000; Biwa et al., 2000b). La aterogénesis está inducida por la estimulación autocrina y paracrina de la proliferación de los macrófagos (Sakai et al., 2000; Rajavashisth et al., 1990). Las células del endotelio vascular y las células de músculo liso presentes en las lesiones secretan GM-CSF en respuesta a las lipoproteínas de baja densidad modificadas (LDLmod) (Rajavashisth et al., 1990). Además, las LDLmod que se acumulan en las lesiones son reconocidas por diferentes tipos de receptores de superficie de los macrófagos infiltrantes, provocando la liberación de GM-CSF, que a su vez activa la proliferación de los macrófagos (Biwa et al., 2000b; Lamharzi et al., 2004). A pesar de que los modelos de proliferación de macrófagos en lesión, basados en experimentos *in vitro*, implican a GM-CSF y a la actividad PI3K en la proliferación de macrófagos (Sakai et al., 2000; Biwa et al., 2000b; Biwa et al., 2000a), Chang no detecta GM-CSF mediante hibridación *in situ* en secciones histológicas de lesión aterosclerótica en los ratones deficientes en ApoE (Chang et al., 2007).

El M-CSF secretado por las células endoteliales aórticas también promueve la proliferación en las placas ateroscleróticas (Antonov et al., 1997). El tratamiento con M-CSF induce la fosforilación en tirosina de su receptor (M-CSFR) y el reclutamiento de la subunidad reguladora de PI3K p85 α hacia el mismo (Varticovski et al., 1989; Kelley et al., 1999). p85 α se fosforila en tirosina tras la estimulación con M-CSF en líneas celulares de macrófagos derivados de médula ósea (BMM) (Kanagasundaram et al., 1996), así como en monocitos humanos (Kelley et al., 1999; Saleem et al., 1995). En los BMM de los ratones deficientes en p85 α , la proliferación y la activación de la señalización temprana (incluyendo la fosforilación de Akt) tras la activación del receptor M-CSFR se

ven reducidas en respuesta a M-CSF, sugiriendo que la clase I_A de PI3K contribuye a este proceso (Munugalavadla et al., 2005). El M-CSF estimula la actividad de PI3K en los macrófagos (Yusoff et al., 1994), siendo la subunidad catalítica p110 α la responsable de la proliferación de los macrófagos mediada por M-CSF (Vanhaesebroeck et al., 1999). No parece probable que la subunidad catalítica de clase I_B de PI3K p110 γ contribuya a la señalización temprana tras la estimulación con M-CSF, ya que los BMM de ratones deficientes en p110 γ no presentan diferencias en la señalización temprana inducida por M-CSF con respecto a los WT (Jones et al., 2003).

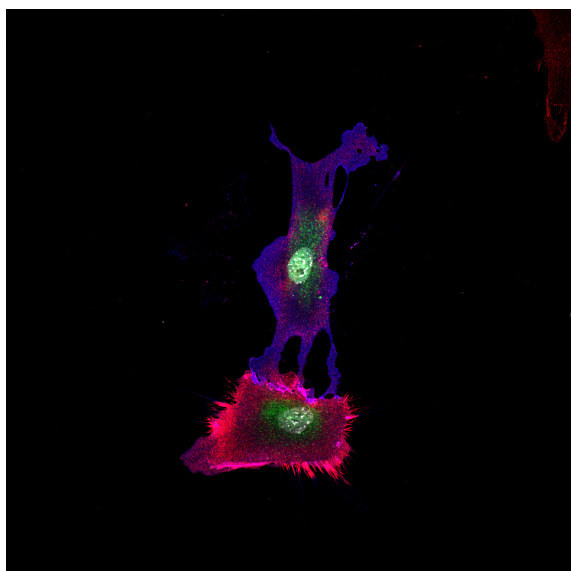
Papel de p110 γ en la aterosclerosis

La delección de p110 γ tiene como resultado la disminución de la severidad en modelos animales de lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide o encefalomiелitis (Barber et al., 2005; Camps et al., 2005; Barber et al., 2006; Berod et al., 2011). Esto se debe en parte a la menor migración de leucocitos como las células T, los monocitos o los neutrófilos a los focos inflamatorios o de las células dendríticas a los nódulos linfáticos que drenan los lugares inflamados en los ratones p110 γ ^{-/-} (Sasaki et al., 2000; Li et al., 2000; Hirsch et al., 2000; Thomas et al., 2008). Estos defectos sugieren el potencial de la inhibición de p110 γ como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. La delección germinal de p110 γ en los ratones deficientes en ApoE atenúa la aterosclerosis murina (Chang et al., 2007). En experimentos *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que p110 γ es necesaria para la activación de Akt en respuesta a LDLox, quimioquinas aterogénicas y a la activación por angiotensina II (Chang et al., 2007). La inhibición farmacológica de p110 γ alivia el desarrollo de la placa de ateroma en ratones ApoE^{-/-} y LDLR^{-/-} y su delección en células hematopoyéticas disminuye el número de macrófagos y de células T en las lesiones (Fougerat et al., 2008). Sin embargo, el mecanismo *in vivo* que subyace a esta menor infiltración de células inflamatorias en ausencia de p110 γ no ha sido clarificado. A pesar de que los BMM deficientes en p110 γ y estimulados con M-CSF presentan menor migración *in vitro* (Jones et al., 2003), la delección de p110 γ no afecta a la diferenciación de monocitos hacia macrófagos (Gobert Gosse et al., 2005). p110 γ regula los niveles de adenosina cíclica monofosfato (cAMP) en los cardiomiocitos a través de un mecanismo independiente de la actividad quinasa, que incluye la interacción de p110 γ y su subunidad reguladora p84/p87^{PIKAP} con la proteína quinasa A (PKA). De este modo, la PKA activa a la fosfodiesterasa 3B (PDE3B) induciendo la degradación del cAMP (Voigt et al., 2006; Perino et al., 2011). No se sabe si p110 γ regula los niveles intracelulares de cAMP en los macrófagos. La proliferación de los macrófagos se ve afectada por los niveles de cAMP intracelulares, de modo que niveles elevados provocan la parada del ciclo celular (Xaus et al., 1999). Además, la proteína de unión al elemento de respuesta del cAMP (CREB) se ha asociado a la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2, poniendo en relación de esta manera los niveles de cAMP intracelulares con la polarización M1/M2 de los macrófagos (Ruffell et al., 2009).

En este trabajo se describe, por un lado, la expresión de p110 δ en las células estromales de los órganos linfoides secundarios, implicadas en la elaboración de la respuesta inmune y en el establecimiento de la inmunocompetencia; lo que supone una función no descrita para PI3K p110 δ en la respuesta inmune. Por otro lado, examinamos la influencia de la delección de p110 γ en la proliferación y polarización de macrófagos en las placas de ateroma, y determinamos si la ausencia de p110 γ reduce las lesiones en los ratones LDLR^{-/-}. Identificamos el papel de p110 γ en la proliferación de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas, mecanismo que podría controlar el tamaño de las placas de ateroma junto con la infiltración de células inmunes.

Igual que un barco sin dirección o sin destino, el trabajo sin un ideal es infructuoso.

Gandhi



OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo experimental presentado en esta tesis ha sido demostrar la importancia de dos subunidades catalíticas de PI3K, p110 δ y p110 γ , en la elaboración de la respuesta inmune y en la patología inflamatoria, respectivamente. Con este fin, nos planteamos los siguientes objetivos:

1- Determinar el papel de p110 δ en la distribución y funcionalidad de las células estromales de los órganos linfoides secundarios y la posible repercusión de este hecho en la respuesta inmune

- Estudio de la organización estructural de los órganos linfoides secundarios de los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mediante el análisis de su estructura así como de la localización de los tipos celulares inmunes tras los experimentos de reconstitución.
- Valorar si, tras la estimulación antigénica, se corrigen los defectos observados en condiciones de homeostasis en los experimentos de reconstitución.
- Análisis de la implicación del estroma de los órganos linfoides secundarios según los resultados obtenidos en los experimentos de reconstitución.
- Implicación de la actividad catalítica de p110 δ en la distribución y en la textura de las poblaciones estromales de los órganos linfoides secundarios.
- Determinar la expresión de p110 δ en las células estromales del bazo y de los nódulos linfáticos.
- Analizar la influencia de la actividad catalítica de p110 δ en la expresión de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento relacionados con la función inmune de las células estromales, en los órganos linfoides secundarios.

2- Analizar la implicación de p110 γ en la aterosclerosis como patología inflamatoria, centrándonos en la proliferación y en la polarización de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas

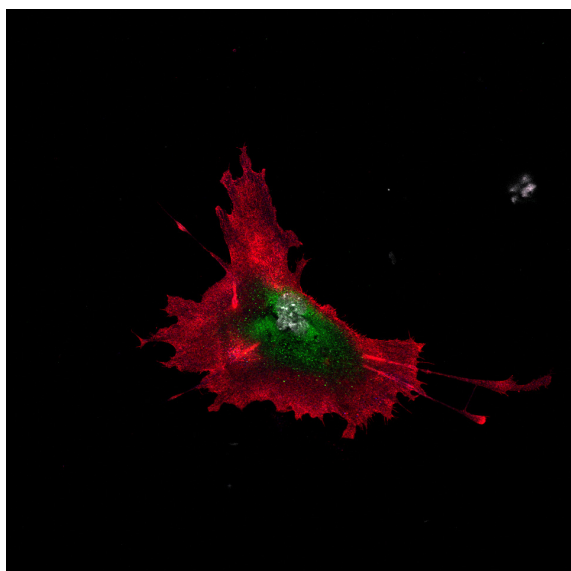
- Resultados de la ausencia de p110 γ en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas en los ratones LDLR^{-/-}.
- Papel de p110 γ en la infiltración de las células inmunes en las placas de ateroma.
- Estudio de la expresión de quimioquinas y de receptores de quimioquinas implicados en la infiltración de las células inmunes a las placas de ateroma en los ratones deficientes en p110 γ .

- Determinar la implicación de $p110\gamma$ en la apoptosis así como en la proliferación de los macrófagos y de las células T en las lesiones ateroscleróticas.
- Análisis de la polarización de los macrófagos hacia los fenotipos M1 y M2 en los ratones deficientes en $p110\gamma$ y en las lesiones ateroscleróticas de los ratones $LDLR^{-/-}p110\gamma^{+/-}$ y $LDLR^{-/-}p110\gamma^{-/-}$.

Les découvertes sont des actes exceptionnels. Très fréquemment de nombreuses petites découvertes ont contribué à l'avancement dans la recherche.

(Los descubrimientos son actos excepcionales. Con mucha frecuencia numerosos pequeños hallazgos han contribuido al avance en la investigación)

Pierre Joliot-Curie (Madrid, 15 de enero de 2013)



**MATERIALES Y
MÉTODOS**

Experimentación animal

En este trabajo se han utilizado distintas líneas de animales: ratones que expresan la subunidad p110 δ catalíticamente inactiva (ratones knock-in; p110 $\delta^{D910A/D910A}$) (Okkenhaug et al., 2002), cedidos por K. Okkenhaug (Brabham Institute, Cambridge, UK); ratones deficientes en el receptor de LDL (LDLR $^{-/-}$) (Ishibashi et al., 1993), denominados Ldlr^{tm1Her} version2 y adquiridos en los Laboratorios Jackson; y ratones deficientes en p110 γ (p110 $\gamma^{-/-}$) (Hirsch et al., 2000), cedidos por M. Wymann (Universidad de Basilea, Suiza) (Hirsch et al., 2000). Los ratones p110 $\gamma^{-/-}$ se mantuvieron en heterocigosis. Se cruzaron ratones LDLR $^{-/-}$ con ratones p110 $\gamma^{+/-}$ y p110 $\gamma^{-/-}$ durante, al menos, siete generaciones, para obtener ratones LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{+/-}$ y LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{-/-}$.

La prole se analizó por PCR para determinar el genotipo. Los animales se criaron y mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos en nuestro animalario. El Comité de Ética para la Experimentación Animal del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) aprobó todos los estudios con animales (referencias 11021, 12021, 12022), cumpliendo con la legislación nacional de la Unión Europea (Directriz 2010/63/EU).

Ensayos de Reconstitución con médula ósea

Se irradiaron en un irradiador- γ ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mediante una sola dosis letal de 10 Gy. Pasadas 3-4 h, los ratones irradiados se reconstituyeron mediante inyección intravenosa (i.v.) con médula ósea total procedente de ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ o p110 $\delta^{D910A/D910A}$. Seis semanas después de la reconstitución, los ratones se sacrificaron y se recogieron el bazo y los LN. La mitad se usaron para estudios de inmunofluorescencia y los restantes para elaborar suspensiones celulares con el objetivo de contar el número total de células de los SLO y para estudiar las poblaciones linfoides en los mismos mediante citometría de flujo.

Análisis de los niveles de lípidos en suero

Ratones LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{+/-}$ y LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{-/-}$ de 12 a 15 semanas de edad se alimentaron con dieta rica en grasa (15.2% de grasa, conteniendo 7.5 g/kg de colesterol (0.75%); Ssniff Spezialdiäten GmbH). Se anestesiaron dichos ratones mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de ketamina (121 mg/kg) y xilacina (14 mg/kg); monitorizando el reflejo de la cola para determinar la eficacia de la anestesia. Se extrajo sangre total mediante sangrado retro-orbital antes (t = 0) y después (t = 2 meses) de tratamiento con dieta grasa; se dejó coagular (a temperatura ambiente (RT), de 3 a 5 h) y se centrifugó para recoger el suero, que se congeló (-20°C). Las muestras congeladas se mandaron a un laboratorio de análisis clínico (Labipath, Madrid) para el análisis de los niveles lipídicos (colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL y triglicéridos).

Crecimiento e inactivación de *Candida albicans*

Candida albicans (*C. albicans*) se obtuvo de la *National Collection of Pathogenic Fungi* (NCPF-3153, serotipo A; Bristol, UK) y es una cepa no patógena (ATCC 36801; nivel de Bioseguridad 1). Se hizo crecer en medio YPD para levaduras (extracto de levaduras al 0.2%, bacto-peptona al 0.1% (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) en agua destilada) suplementado con glucosa 2 M y ampicilina (1/1000). La muestra se diluyó varias veces en medio YPD líquido y se cultivó en agar YPD (extracto de levaduras al 0.2% + bacto-peptona al 0.1% + agar al 0.24% (BD Biosciences); 24°C, 24-48 h). Una colonia de una de las placas con crecimiento se cultivó en 500 ml de medio YPD líquido (130 rpm, 24°C, 18 h) para obtener una suspensión de levaduras, que se centrifugó (750 xg, 4°C, 1 h), el precipitado se lavó en PBS estéril y se centrifugó de nuevo (750 xg, 4°C, 1 h). Este precipitado de *C. albicans* se inactivó por calor en un baño de agua (65-67°C, 4 h) mediante agitación de los tubos cada 10-15 min (la inactivación se confirmó mediante la ausencia de crecimiento de *C. albicans* tras su cultivo en agar YPD (24°C, 48-72 h)). Las alícuotas de *C. albicans* se almacenaron en PBS estéril (4×10^8 células/ml, 4°C).

Inducción de la respuesta inmune con *C. albicans* inactivada por calor

Para confirmar en los ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ que la inyección de *C. albicans* inactivada inducía una expansión sistémica de las células T CD4⁺ (Rosati et al., 1995; Scaringi et al., 1995), se inyectaron i.p. 10^6 células de *C. albicans* inactivada a ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y se analizó mediante citometría de flujo el número total de células T CD4⁺ en el bazo y en los LN paraaórticos a varios tiempos tras la inyección (2, 5, 7, 9 o 21 días). Se eligieron los LN paraaórticos ya que son los principales LN que drenan la cavidad peritoneal. Se observó una expansión de las células T CD4⁺ tanto en el bazo como en los LN paraaórticos procedentes de los ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ (Figura M1A, B). Una vez confirmado lo adecuado de la técnica, se inyectó *C. albicans* a ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$ reconstituidos y sin reconstituir. Los ratones se sacrificaron 5 días después de la inyección, coincidiendo con el pico máximo de expansión de células T CD4⁺ (Figura M1A, B), y se extrajeron el bazo y los nódulos linfáticos para analizar mediante citometría de flujo la población de células T CD4⁺ de dichos órganos.

Tinción de hematoxilina-eosina de secciones histológicas

Secciones de bazo congeladas procedentes de ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$ reconstituidos y sin reconstituir se tiñeron con hematoxilina-eosina para analizar el área de los folículos linfoides. Por otro lado, los ratones LDLR^{-/-}p110 $\gamma^{+/-}$ y LDLR^{-/-}p110 $\gamma^{-/-}$ alimentados durante dos meses con dieta rica en grasa se anestesiaron mediante inyección i.p. con 150 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilazina para realizar la perfusión antes de sacrificarlos. Se monitorizó el reflejo de la cola para determinar la eficacia de la anestesia y se perfundieron los corazones con paraformaldehído al 4% (PFA). Una vez sacrificados, se extrajeron los corazones y se incluyeron en parafina. Se tiñeron secciones de seno aórtico de ratones LDLR^{-/-}p110 $\gamma^{+/-}$ y LDLR^{-/-}p110 $\gamma^{-/-}$ con hematoxilina-eosina para determinar el área de lesión. Para ello, se descongelaron las secciones de

bazo procedentes de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ (RT, 45 min), se fijaron en PFA al 4% (10 min) y se lavaron en agua destilada (3 x 3 min). Las secciones de seno aórtico de los ratones $LDLR^{-/-}p110\gamma^{+/-}$ y $LDLR^{-/-}p110\gamma^{-/-}$ se desparafinaron en xileno y se hidrataron en etanol. Después, se incubaron todas las secciones en hematoxilina de Mayer (Sigma, St. Louis, MO; 15 min) y se lavaron en agua (10 min). Las secciones se incubaron en eosina al 1% (2-4 min), se lavaron 2 veces en etanol al 70%, se deshidrataron en etanol al 95% (3 min), etanol al 100% (3 min) y xileno (3 min), se montaron en Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania) y se secaron a 37°C. Las imágenes se adquirieron con una cámara Olympus (DP70) adaptada a un microscopio Leica (vertical Leitz DM RB) con un objetivo de 5X. Las cuantificaciones se realizaron con el software ImageJ.

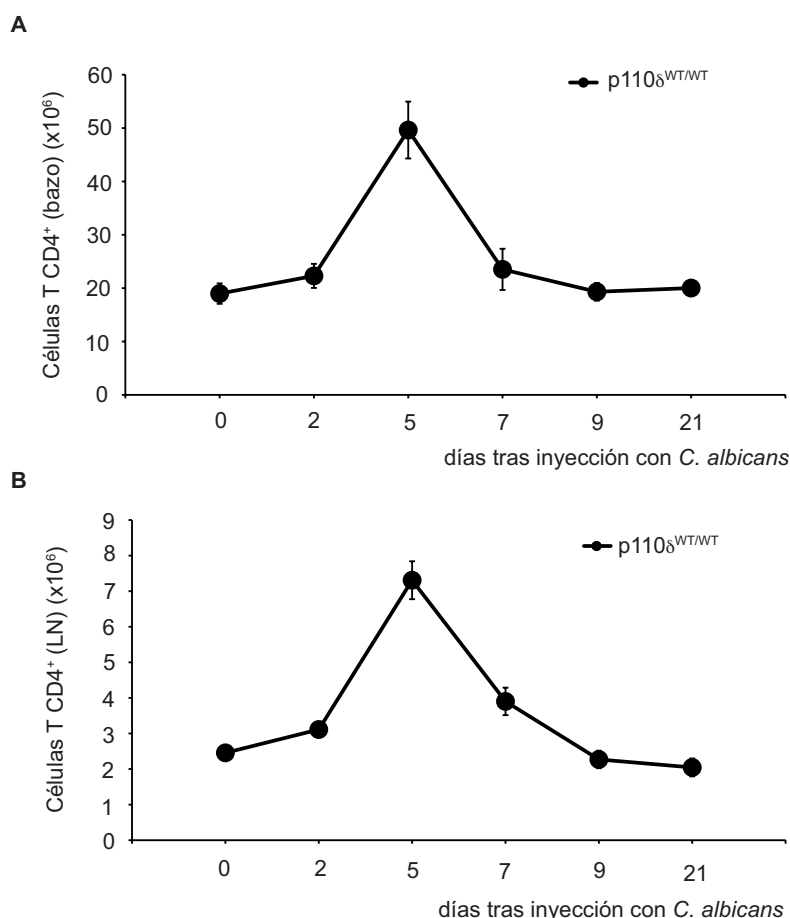


Figura M1. Estimulación de la respuesta T CD4⁺ en los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ inyectados con *C. albicans* inactivada por calor. Se inyectó *C. albicans* inactivada por calor a ratones $p110\delta^{WT/WT}$ a los tiempos indicados (0, 2, 5, 7, 9 y 21 días) para estimular la respuesta inmune. Las células T CD4⁺ totales de los bazo (A) y de los LN (B) de dichos ratones se contaron antes ($t = 0$) y a distintos tiempos tras la inyección con *C. albicans* ($n = 6-10$ ratones). Media \pm SD.

Inmunofluorescencia de secciones histológicas para detectar poblaciones de células inmunes y estromales

Secciones congeladas de bazo y LN de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ se analizaron mediante inmunofluorescencia para estudiar la distribución y localización de subtipos de células inmunes (Células T $Thy1.2^+$ y $CD3^+$, MMM MOMA-1⁺, células B $B220^+$, MZM $SIGNR1^+$, DC $CD11c^+$) o estromales (RPF α -5 integrina⁺, MRC $RANKL^+$, FRC $gp38^+CD31^-$ y LEC $gp38^+CD31^+$). También se estudió mediante inmunofluorescencia la distribución del marcador general de estroma ER-TR7. Antes de la tinción, se descongelaron los cortes (RT, 45 min) hasta que estuvieron completamente secos, se fijaron en PFA al 4% (RT, 10 min) y se lavaron en PBS. En los casos en que se usaron anticuerpos biotinilados, las secciones se pretrataron con el kit *Avidin/Biotin Blocking kit* (Vector Laboratories, Burlingame, CA); después se bloquearon con solución de bloqueo ((BSA al 1% (Sigma) + suero de cabra al 10% en PBS; RT, 30 min)) y, sin lavar, se incubaron (4°C, o/n) con los anticuerpos primarios para los antígenos (SIGNR1, B220, CD3, Thy1.2, MOMA-1, CD11c, α -5 integrina, RANKL, gp38 y ER-TR7) (Tabla M2). Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron (RT, 45 min) con el anticuerpo secundario apropiado (estreptavidina-Cy5, anti-rata-Alexa488 o anti-hamster IgG-Cy3). Las preparaciones se volvieron a lavar y se montaron en Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL). Las imágenes se adquirieron con un microscopio Zeiss LSM-510 META ConfoCor2 con un objetivo de 10X.

Análisis de la red de células estromales mediante el plugin *Texture Measure* para ImageJ

Se midió la textura local de cada región seleccionada de SLO de acuerdo a algunos descriptores de textura (Haralick et al., 1973), implementado en el software NIH-ImageJ con el plugin *GLCM Texture*. Cada descriptor buscar definir con un solo número una matriz numérica que incluye las medidas de la relación de intensidad de un píxel con su entorno. Se midieron 5 descriptores de textura a 4 orientaciones (0°, 90°, 180° y 270°) y a dos pasos de píxel (1 y 3) para 400 campos seleccionados de cada genotipo ($p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$). Este análisis produjo un vector de 40 dimensiones para cada campo analizado (5 valores correspondientes a los descriptores de textura x 4 orientaciones analizadas x 2 pasos de píxel), que fue sometido al análisis de componentes principales (Pearson, 1901) con el objetivo de reducir el vector de 40 dimensiones a uno de 10 dimensiones para cada uno de los campos analizados. Estos vectores se clasificaron en Matlab usando el análisis discriminante lineal con la estimación de covarianza de clases de Mahalanobis. La significancia de la precisión en la clasificación de los vectores $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ se computó mediante su comparación con una distribución nula resultante de realizar repetidamente el análisis discriminante lineal tras haber asignado los carteles $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ aleatoriamente a las 800 vectores obtenidos (400 campos analizados/genotipo). De este modo y como se muestra en la Figura M2, la gráfica final representa en azul la distribución nula y en rojo la medida de la significancia tras haber asignado los carteles $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ correctamente.

Se consideran diferencias significativas en la textura entre los dos genotipos analizados cuando este valor (barra roja) se encuentra fuera de la distribución nula ($p = 0.005$).

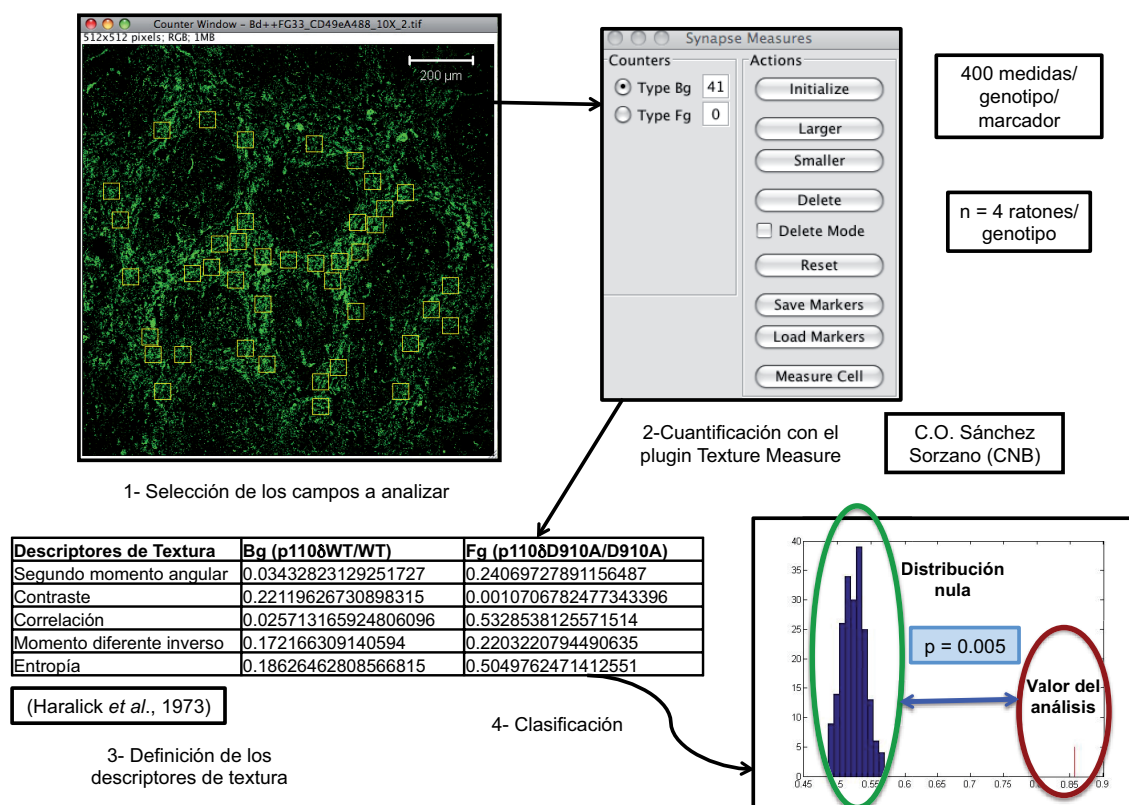


Figura M2. Análisis de la textura de las poblaciones estromales de los órganos linfoides secundarios mediante el plugin *Texture Measure* para ImageJ. Se seleccionaron los campos de interés a analizar en imágenes de inmunofluorescencia procedentes de ratones p110 δ ^{WT/WT} y p110 δ ^{D910A/D910A} para los distintos marcadores de estroma ($n = 4$ ratones/genotipo), llegando a un total de al menos 400 campos/genotipo. Después, se cuantificaron esos campos con el plugin *Texture Measure* para ImageJ, diseñado específicamente para este tipo de cuantificaciones. Este plugin dio como resultados 5 valores numéricos para cada campo analizado que responden a 5 descriptores de textura (Haralick et al., 1973). Dichos valores se agruparon en un solo vector de 10 dimensiones para cada campo tras el análisis de componentes principales (Pearson, 1901). Los vectores resultantes se clasificaron en Matlab usando el análisis discriminante lineal con la estimación de covarianza de clases de Mahalanobis. La gráfica muestra el valor de la significancia de esa clasificación cuando los carteles p110 δ ^{WT/WT} y p110 δ ^{D910A/D910A} son asignados aleatoriamente a los vectores de los 800 campos analizados (distribución nula, azul) y cuando son asignados correctamente (barra roja). Las diferencias entre la textura de las poblaciones estromales p110 δ ^{WT/WT} y p110 δ ^{D910A/D910A} se consideran significativas cuando la barra roja se encuentra fuera de la distribución nula, como en el ejemplo mostrado.

Inmunofluorescencia para detectar p110 δ en secciones histológicas de órganos linfoides secundarios procedentes de ratones p110 δ ^{WT/WT}

Secciones congeladas de bazo y de LN paraaórticos se almacenaron a -80°C . Antes de la tinción, los cortes se descongelaron (RT, 45 min) hasta que estuvieron

completamente secos y se fijaron en PFA al 4% (RT, 10 min). Tras varios lavados en PBS, se bloquearon las secciones en solución de bloqueo (BSA al 1% + suero de cabra al 10% en PBS; RT, 30 min) y se incubaron con el anticuerpo dirigido a proteínas de membrana (anti-gp38) (4°C, o/n). Los cortes se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-hamster IgG-Cy3; RT, 45 min). Para la tinción de proteínas intracelulares, se bloquearon las secciones y se permeabilizaron (BSA al 1% + suero de cabra al 10% en PBS con Triton X-100 al 0.1%; RT, 30 min), se incubaron con el anticuerpo primario (anti-p110 δ ; 4°C, o/n) seguido del anticuerpo secundario (anti-conejo-Alexa488; RT, 45 min). Las secciones se tiñeron con DAPI (1/300 en BSA al 1% en PBS; RT, 10 min) y se montaron en Fluoromount-G. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal Leica SP5 con un objetivo de inmersión de 63X y se analizaron con ImageJ. Los anticuerpos utilizados se muestran en la [Tabla M2](#).

Cuantificación de la tinción de inmunofluorescencia para detectar p110 δ en las secciones histológicas de los órganos linfoides secundarios de los ratones p110 $\delta^{WT/WT}$

Se midió la diferencia entre muestras positivas y negativas para cada uno de los canales de fluorescencia en muestras de bazo y de LN. Para cada tipo de SLO, se usaron 7 imágenes representativas; en cada imagen, se midió la intensidad media de fluorescencia en 5 localizaciones gp38⁺ y 5 gp38⁻ y se computó la diferencia de intensidad para las 25 combinaciones posibles. Se repitió este proceso para cada una de las 7 muestras y se agregaron las diferencias en un único vector. Finalmente, se computó la probabilidad *a posteriori* de que esta diferencia fuera menor que cero (reportado como p-valor). Este proceso elimina las posibles diferencias de intensidad entre las imágenes, y proporciona un modo simple de probar la hipótesis de que las diferencias entre las regiones positivas (gp38⁺) y negativas (gp38⁻) sean positivas (prueba de una cola).

Análisis de la infiltración de macrófagos y de células T en las lesiones de aterosclerosis mediante inmunohistoquímica

Secciones seriadas de la región del seno aórtico de ratones LDLR^{-/-}p110 $\gamma^{+/-}$ y LDLR^{-/-}p110 $\gamma^{-/-}$ alimentados durante dos meses con dieta grasa se tiñeron mediante inmunohistoquímica para detectar células T (CD3⁺), macrófagos (Mac-3⁺) y células T reguladoras (Foxp3⁺). Las secciones se desparafinaron e hidrataron, como se ha descrito previamente. Se expusieron los antígenos con tampón citrato de sodio (15 min). Después, se bloquearon las muestras con peroxidada (*Peroxidase Block*, Dako, Glostrup, Denmark) y se incubaron (RT, 1 h) con los anticuerpos primarios anti-Mac-3, -Foxp3 y -CD3 ([Tabla M2](#)). Tras varios lavados en TBS-Triton X-100 al 0.3%, el tejido se incubó con *EnVision System-HRP (AEC) anti-rabbit* para tejidos de ratón (Dako) y con *Simple Stain Rat MAX PO anti-rat* para tejidos de ratón (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) (RT, 1 h). La señal se desarrolló con el sustrato cromógeno AEC (3-amino 9-etilcarbazol, Dako; 15 min). Las muestras se contratiñeron con hematoxilina y se montaron en medio de montaje acuoso

(Fluoromount-G). Las fotos se tomaron con una cámara Olympus (DP70) acoplada a un microscopio Leica (vertical Leitz DM RB) utilizando un objetivo de 10X.

Análisis de la proliferación de las células T y de los macrófagos *in vivo*, determinación de la apoptosis en las lesiones con caspasa-3 activa y detección de las células de músculo liso en las lesiones ateroscleróticas

La proliferación de los macrófagos y de las células T, así como la apoptosis y la presencia de células de músculo liso, se analizaron mediante tinción de inmunofluorescencia de la zona de la válvula aórtica de secciones de corazón procedentes de ratones LDLR^{-/-} p110^{γ+/-} y LDLR^{-/-} p110^{γ-/-} alimentados con dieta grasa durante 2 meses. Los marcadores utilizados fueron Mac-3 (para macrófagos), CD3 (para células T) y Ki67 (marcador de proliferación), caspasa-3 activa (como marcador de apoptosis) y α actina de músculo liso (para células de músculo liso). Las secciones se incubaron (65°C, 30 min) para mejorar la adhesión de los cortes antes del proceso de desparafinado e hidratación. Los antígenos se expusieron con tampón citrato de sodio y las secciones se delimitaron haciendo uso del Pap Pen (Research Products International, Mount Prospect, IL). Las muestras se bloquearon con BSA al 1% en PBS para las tinciones de proliferación y con BSA al 3% en Triton X-100 al 0.25% en PBS para el resto de tinciones (RT, 45 min). Los anticuerpos primarios (anti-Ki67, CD3, Mac-3, α SMA y caspasa-3-activa; [Tabla M2](#)) se diluyeron en solución de bloqueo. Tras varios lavados en PBS, se incubaron las muestras (RT, 45 min en cámara húmeda) con el anticuerpo secundario apropiado (anti-rata-Alexa647 o Alexa546 o anti-conejo-Alexa488; [Tabla M2](#)) diluido en solución de bloqueo. Los núcleos se tiñeron con DAPI (15 min), se lavaron en PBS, y las preparaciones se montaron en Fluoromount-G o en *Slow Fade Gold Antifade Reagent* (Invitrogen, Grand Island, NY). Las imágenes se adquirieron con un microscopio Zeiss LSM-510 META ConfoCor2 o bien con un microscopio Leica SP5 utilizando un objetivo de 40X de inmersión, y se analizaron con el software LSM-FCS y con ImageJ.

Determinación *in vivo* de la apoptosis en lesión mediante tinción TUNEL

La apoptosis en lesiones de aterosclerosis se analizó mediante tinción de inmunofluorescencia TUNEL y la detección de caspasa-3-fragmentada (ya descrita) en secciones de seno aórtico procedentes de ratones LDLR^{-/-} p110^{γ+/-} y LDLR^{-/-} p110^{γ-/-} alimentados durante 2 meses con dieta rica en grasa. Para la tinción de TUNEL, se incubaron las secciones (65°C, 30 min) para mejorar la adhesión antes de proceder a su desparafinado e hidratación; se lavaron varias veces con PBS y se permeabilizaron (Triton X-100 al 0.5% en PBS, RT, 10 min). Se preincubaron los cortes (RT, 15 min) con tampón TdT1X + 1 mM CoCl₂ (Tampón TdT1X: Tris-HCl 125 mM, 1.25 mg/ml de BSA, cacodilato de sodio 1 M (los dos últimos de Sigma), pH 6.6), en oscuridad y en cámara húmeda (como se hizo para todas las incubaciones). Después, se incubaron las secciones con la mezcla de reacción (transferasa terminal recombinante y biotina-16-dUTP (ambas de Roche, Reinach, Suiza) diluidas en tampón TdT1X + CoCl₂ 1 mM (37°C, 1 h), y se lavaron

a continuación con tampón TdT1X + CoCl₂ 1 mM (RT, 10 min). La reacción se paró con Tween 20 al 0.01% en PBS. Se lavaron las secciones y se incubaron con estreptavidina-Cy5 (RT, 1 h). Los núcleos se tiñeron con DAPI (RT, 15 min) y las preparaciones se montaron con Fluoromount-G. Las imágenes se sacaron con un microscopio confocal Leica SP5 con un objetivo 40X de inmersión y se analizaron con ImageJ.

Estudio *in vivo* de los macrófagos de tipo M1 y M2

Los macrófagos M1 (Mac-3⁺iNOS⁺) y M2 (Mac-3⁺arginasa-1⁺) se analizaron mediante inmunofluorescencia de secciones de seno aórtico de ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} alimentados durante 2 meses con dieta rica en grasa. La tinción se realizó del mismo modo que para el estudio de la proliferación de las células T y de los macrófagos en lesión ya descrito, pero incluyendo la incubación con el anticuerpo purificado anti-ratón IgG antes del bloqueo. Los anticuerpos primarios fueron anti-iNOS, arginasa-1 y Mac-3. Los anticuerpos secundarios fueron anti-rata-Alexa546, anti-conejo-Alexa488 o anti-ratón IgG-Cy5, diluidos en solución de bloqueo. Las imágenes se sacaron con un microscopio confocal Leica SP5 con un objetivo 40X de inmersión y la cuantificación se realizó con ImageJ. Los detalles sobre los anticuerpos utilizados aparecen en la [Tabla M2](#).

Aislamiento y cultivo de las células estromales del bazo y de los nódulos linfáticos

Se extrajeron el bazo y los LN periféricos (axilares e inguinales) de ratones p110^δ^{WT/WT} y se utilizaron para extraer poblaciones de células estromales ([Fletcher et al., 2011](#); [Rehm et al., 2011](#)). Se extrajeron los LN periféricos ya que contienen un mayor porcentaje de FRC que los nódulos linfáticos mesentéricos ([Fletcher et al., 2011](#)) y se buscaba la purificación de FRC. Los SLO se trocearon en trozos muy pequeños y se lavaron en medio RPMI-1640 sin suero (Lonza, Walkersville, MD). El material se separó en grupos (máximo 5 bazos/grupo; máximo LN de 7 ratones/grupo) y se incubaron con una mezcla enzimática para su digestión (1 mg/ml de colagenasa D (grupo de bazo, 37°C, 35 min) o 0.8 mg/ml de colagenasa D + 0.8 mg/ml de dispasa, ambas de Roche (grupos de LN, 37°C, 20 min)). Los grupos de bazo y LN se resuspendieron para reducir los agregados tisulares. El sobrenadante se recogió con 10 ml de tampón de lavado (FBS al 2% + EDTA 5 mM en PBS), se centrifugó (300 xg, 4°C, 5 min) y el precipitado se conservó en hielo. Este paso se repitió 4 veces hasta que la mayoría del tejido se disgregó. Los precipitados de estos grupos se recogieron y se resuspendieron en medio de FRC (medio MEM con modificación alpha (Sigma) suplementado con antibióticos al 1% y con 10% de FBS). Las células totales se contaron y se plaquearon en el mismo medio (3-5 x 10⁶ células/ml). Desde entonces se cambió el medio cada 2 días.

Inmunofluorescencia de células estromales en cultivo

Se aislaron las células estromales del bazo y de los LN de ratones p110^δ^{WT/WT} según se ha descrito ([Fletcher et al., 2011](#); [Rehm et al., 2011](#)). Se pretrataron los cubres

con poly-L-lisina (1/10; Sigma) durante al menos 3 h (37°C), después se lavaron 2 veces en PBS estéril y filtrado. Se situaron los cubres en placas de cultivo de 6 pocillos, y se añadieron las células despegadas en medio de FRC (5×10^4 células/ml). Se dejaron adherir a la placa (37°C, o/n). Se quitó el medio y se fijaron las células en PFA al 4% (RT, 20 min). Tras lavar en PBS, las células se bloquearon en solución de bloqueo (BSA al 1% + suero de cabra al 10% en PBS; RT, 30 min) y se incubaron con los anticuerpos anti-proteínas de membrana (anti-gp38 y anti-CD31 o anti-F4/80; 4°C, o/n). Se lavaron las células en PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios (anti-hamster IgG-Cy3 y anti-rata IgG-Alexa647; RT, 45 min). Para marcar las proteínas intracelulares, se bloquearon las células y se permeabilizaron (BSA al 1% + suero de cabra al 10% en PBS con Triton X100 al 0.1%; RT, 30 min), se incubaron con el anticuerpo primario anti-p110 δ (4°C, o/n), seguido del anticuerpo secundario anti-conejo-Alexa488 (RT, 45 min). Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (1/300 en BSA al 1% en PBS; RT, 10 min). Finalmente, las células se lavaron en agua destilada y las preparaciones se montaron con Fluoromount-G. Las imágenes se tomaron en un microscopio confocal Leica SP5 usando un objetivo 40X de inmersión y se analizaron con ImageJ. Los anticuerpos utilizados se detallan en la [Tabla M2](#).

Extracción y cultivo de macrófagos peritoneales y ensayo de captación de LDL acetilado

Los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} se sacrificaron con CO₂. Los macrófagos peritoneales se obtuvieron tras inyectar i.p. 8 ml de medio DMEM sin suero en la cavidad peritoneal, que se extrajo a continuación con una aguja de 21G. Las células se plaquearon y se cultivaron durante 2 h (37°C). Después, se lavaron para eliminar las células no adheridas y el resto de células (adheridas) se utilizaron para los ensayos de captación de LDLac. Para ello, los macrófagos peritoneales se incubaron durante 3 h con LDLac-Alexa488 (1 μ g/ml, Invitrogen) en medio sin suero. Después, se recogieron las células y se cuantificó la captura de LDLac-Alexa488 como la mediana de la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCanto (BD Biosciences).

Extracción y cultivo de macrófagos derivados de médula ósea

Los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} se sacrificaron con CO₂. Los BMM se obtuvieron a partir de suspensiones de médula ósea procedentes del fémur, de la tibia y del peroné de dichos ratones. Estas suspensiones de progenitores de médula ósea se dejaron diferenciar a macrófagos durante 7 días en medio DMEM suplementado con antibióticos, con FBS al 20% y con 3 ng/ml de M-CSF recombinante (PeproTech, Rocky Hill, NJ).

Análisis del ciclo celular de los macrófagos

Los BMM se sincronizaron en G0/G1 mediante 36 h de privación de M-CSF (DMEM + FBS al 10% + medio condicionado de células L929 al 0.5%). Después, se estimularon a diferentes tiempos con DMEM + FBS al 10% + medio condicionado de células L929

al 10% como fuente de M-CSF o con DMEM + FBS al 10% + 10 ng/ml de GM-CSF recombinante (Peprotech). Los macrófagos se tripsinizaron, se recogieron y se fijaron en etanol al 80% (-20°C, 1 h). Posteriormente, se incubaron las células por lo menos 30 min con 50 μ g/ml de yoduro de propidio (PY) (Sigma) + 0.25 mg/ml de RNasa A (Sigma). Las células marcadas se analizaron en un citómetro FACSCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y los histogramas de DNA obtenidos se ajustaron a la distribución de ciclo celular usando el software MultiCycle AV (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

Medida del AMP cíclico intracelular en macrófagos mediante *Western blot*

Se diferenciaron *in vitro* BMM y se estimularon con M-CSF a distintos tiempos (0, 24 y 48 h). Las células se lavaron en PBS y se lisaron en tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, pH 7.5, 1% (w/v) de Triton X-100, NaCl 137 mM y 5% de glicerol, suplementado con inhibidores de fosfatasa y de proteasas (Sigma)). Se cuantificó la proteína con el Kit *Micro BCA Protein Assay* (Thermo Scientific, Waltham, MA). Las muestras se analizaron en un SDS-PAGE al 12%, y la expresión de cAMP se detectó en *western blot* con *anti-cAMP-loaded proteins** y ECL (Amersham, Barcelona, Spain). Como control de carga se analizó β -actina. Para la cuantificación se empleó el software ImageJ. *El anticuerpo *anti-cAMP-loaded proteins* (Abcam; ab24851) reconoce proteínas que llevan unido cAMP. Por ello, se analizaron varias bandas de diferentes pesos moleculares que se repiten en los experimentos realizados, para determinar el efecto de la delección de p110 γ y de la estimulación con M-CSF sobre el cAMP intracelular.

Medida del AMP cíclico intracelular en macrófagos mediante ELISA

Se obtuvieron BMM de ratones p110 $\gamma^{+/-}$ and p110 $\gamma^{-/-}$ como se ha descrito. Una vez diferenciados, se produjo una parada en su ciclo celular mediante 18 h de privación de M-CSF. Después, se levantaron de las placas de cultivo y se contaron. A continuación, se lisaron las células con el volumen de tampón de lisado del Kit *Parameter Cyclic AMP Assay kit* (KGE002B, R&D Systems, Minneapolis, MN) necesario para que la concentración final fuera 10⁷ células/ml. Los lisados se congelaron (-80°C) y el ELISA se desarrolló de acuerdo con las instrucciones del Kit.

Polarización de los macrófagos derivados de médula ósea hacia los fenotipos M1 o M2

Tras la diferenciación de los BMM, las células se plaquearon en placas de 6 pocillos (1-2 x 10⁶ células/pocillo) y se incubaron (24 h) en medio DMEM completo (FBS al 10%, antibióticos, glutamina 2 mM) con 10 ng/ml IL-4 (Peprotech) para la diferenciación hacia macrófagos de tipo M2, o 10 ng/ml IFN γ (Peprotech) y 100 ng/ml lipopolisacárido (LPS; Sigma), para la diferenciación hacia macrófagos de tipo M1. Se lavaron las células en PBS frío, se resuspendieron en 0.6-1 ml de TRI Reagent (Sigma), y se almacenaron a -80°C hasta la extracción del RNA.

Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR

Se extrajo RNA del bazo y de los nódulos linfáticos de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$. También, se extrajo el RNA con Trizol (Invitrogen) de cayado aórtico y aorta torácica descendente de ratones $LDLR^{-/-}p110\gamma^{+/-}$ y $LDLR^{-/-}p110\gamma^{-/-}$, así como de BMM procedentes de ratones $p110\gamma^{+/-}$ y $p110\gamma^{-/-}$ diferenciados hacia fenotipo M1 o bien M2. El cDNA se obtuvo de 1 μ g de RNA total usando el Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription 496 thermocycler* (MWG AG Biotech, Ebersberg, Germany). Se usaron varias diluciones de cDNA para la amplificación por PCR en una ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) y usando el tampón *HOTFire Pol 5x* (Solis Biodyne, Tartu, Estonia). Los oligonucleótidos usados como cebadores se detallan en la [Tabla M1](#). La amplificación se llevó a cabo a 95°C, 10 min; 40 ciclos, 95°C, 15 seg; 60°C, 20 seg; 72°C, 30 seg. Para confirmar la pureza de la misma, se realizó una curva de disociación a 95°C, 15 seg; 60°C, 15 seg y 2% de rampa durante 20 min hasta 95°C. Para $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$, los niveles de mRNA se normalizaron con un control $p110\delta^{WT/WT}$, y para $LDLR^{-/-}p110\gamma^{+/-}$ y $LDLR^{-/-}p110\gamma^{-/-}$, con un control $LDLR^{-/-}p110\gamma^{+/-}$, usando el método para la cuantificación relativa de datos procedentes de qRT-PCR, $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Con este mismo método, para $p110\gamma^{+/-}$, los niveles de mRNA se normalizaron con un control $p110\gamma^{+/-}$ no-diferenciado y para $p110\gamma^{-/-}$ con un control $p110\gamma^{-/-}$ no diferenciado. El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relaciona la señal de la PCR de la muestra problema con otra de una muestra control. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (RQ) representa la cantidad de muestra problema, normalizada frente a una referencia endógena y relativa a un calibrador. Los resultados se analizaron con el software SDS v2.2.2 (Applied Biosystems).

Análisis de las poblaciones inmunes de los órganos linfoides secundarios mediante citometría de flujo

Las células de los SLO procedentes de ratones reconstituidos y sin reconstituir se procesaron y tiñeron para analizar las poblaciones inmunes mediante citometría de flujo. Se obtuvieron suspensiones celulares a partir de bazo y de LN paraaórticos y periféricos. Se contaron las células totales mediante tinción de exclusión con azul Trypan. Las células se pasaron a placas de 96 pocillos y se lavaron 2 veces en *PBS de staining* (FCS al 1% + BSA al 0.5% + NaN_3 al 0.065% en PBS). Entre los lavados, se centrifugaron las placas (800 xg, 4°C, 5 min). Se incubaron las células en oscuridad con los anticuerpos adecuados anti-CD3(b), -CD4, -CD44, -CD62L, -B220, -IgM, -IgD, -CD21 y -CD23 (4°C, 20 min) ([Tabla M2](#)), se lavaron en *PBS de staining* y se transfirieron a tubos de citómetro para el análisis por FACS (Gallios Flow Cytometer, Beckman Coulter). Los datos se analizaron con el software Kaluza (Beckman Coulter).

Análisis de la expresión de CXCR3 en las células T CD4^+ y CD8^+ procedentes de ratones $p110\gamma^{+/-}$ y $p110\gamma^{-/-}$

Se sacrificaron los ratones con CO_2 . Se extrajeron sus bazos y se prepararon

suspensiones celulares a partir de ellos. Se enriquecieron dichas suspensiones en células T, mediante la depleción de las células B y de los granulocitos con los anticuerpos anti-B220(b) y anti-Gr1 biotinilados (Tabla M2), seguida de la separación magnética con bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads, Dynal, Invitrogen). La suspensión celular resultante se incubó (2 h) en flasks de cultivo para permitir la unión de las células adherentes al plástico. Las células no adherentes se recogieron y se determinó su pureza mediante citometría de flujo (anti-CD3(c)), hasta obtener un 90% de la misma. La expresión de CXCR3 se determinó mediante citometría de flujo (Gallios Flow Cytometer) con un anticuerpo anti-CXCR3 y se analizó con el software Kaluza y con el FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Tinción de sangre periférica de ratones LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} y LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} para detectar las poblaciones circulantes

Se extrajo sangre periférica de los ratones LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} y LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mediante sangrado retro-orbital como se ha descrito anteriormente. Se depositó esta sangre en tubos con EDTA y se mantuvo a RT hasta su uso. Se preparó una mezcla de PFA al 4% con Versalyse de modo que la concentración final del PFA fuera del 0.1%. Se depositó la sangre (20-30 μ l) en el fondo de tubos de citómetro, intentando no tocar las paredes. Se añadieron 50 μ l del pool de anticuerpos a la dilución recomendada y se mezclaron bien con la pipeta. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD45, -CD11b, -Ly6C, -CD3(c), -Gr1(b) (Tabla M2). Se incubaron (RT, 20 min). En el caso en que se utilizará un anticuerpo biotinilado, se añadieron 500 μ l de PBS (RT), y se centrifugó el tubo (15 min, 1500 rpm). Después, se decantó el sobrenadante, se añadieron 50 μ l de la correspondiente avidina (avidina-EF450) y se incubó la muestra (RT, 20 min, oscuridad). Pasado este tiempo, se añadió 1 ml de la solución de Versalyse-formaldehído (0.1%), y se agitaron inmediatamente las mezclas en un Vortex de (1 - 3 segundos). Por último, se incubaron los tubos (RT, 10 min, oscuridad) y se analizaron las muestras mediante citometría de flujo (Gallios Flow Cytometer).

Análisis estadístico

Los datos se representaron como la media \pm SD. La mayoría de los análisis se realizaron usando el test T de Student para comparar distintos parámetros en dos grupos de ratones independientes (p110^δ^{WT/WT} y p110^δ^{D910A/D910A}, LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} y LDLR^{-/-}p110^{γ-/-}, o p110^{γ+/-} y p110^{γ-/-}). Donde se indica, los datos obtenidos mediante recuento de muestras pequeñas se compararon mediante el test Poisson. También se usó el test de Kolmogorov-Smirnov para analizar muestras cuya distribución no era gaussiana. En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas para p<0.05 (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Gen	Cebador directo (5' - 3')	Cebador inverso (5' - 3')
CCL19	TGGTTCTCTGGACCTTCCCA	CACGATGTTCCCAGGGATG
CCL21	GGGAAACAAAGCCCCGG	GCTGTGTCTGTTCAAGTTCTCTTG
CXCL13	GATTCAAGTTACGCCCCCTG	ACCATTGTCACGAGGATTG
CCR7	CAAAAGCACAGCCTTCCTGTG	AAATGACAAGGAGAGCCACCA
CXCR5	ATCAGACAGTGACCAGCCTGGT	CGTGCTGTTACTGTAGAAGGCC
LTα	CACACTGCCGCTTCCTCTAT	CCGAGCAGTGTCATGTGG
LTβ	CCTGGTGACCCTGTTGTTG	TGCTCCTGAGCCAATGATCT
LTβR	GCTCCAGGTACCTCCTACTCG	ATGGCCAGCAGTAGCATTG
TNFα	CTGTAGCCACGTCGTAGC	TTGAGATCCATGCCGTTG
NOS	GCTGTGCTCCATAGTTTCCAG	GGACCAGCCAAATCCAGTC
L-12	TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG	ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT
Arginasa-1	TCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
L-10	AGGCGCTGTCATCGATTTCTC	TGGCCTGTAGACACCTTGGTC
YM1	ACTTTGATGGCCTCAACCTG	AATGATTCTGCTCCTGTGG
CXCR3	ACCAGCCAAGCCATGTACCTT	CGCTCTCGTTTTCCCATAA
CXCL9	TCTGCCATGAAGTCCGCTG	CAGGAGCATCGTGCAATCCT
CXCL10	TGCTGGGTCTGAGTGGGACT	CCCTATGGCCCTCATTCTCAC
CCR2	TGCCTGCAAAGACCAGAAGA	GCCGTGGATGAACTGAGGTAA
CCR5	TCCGTTCCCCCTACAAGAGA	TTGGCAGGGTGCTGACATAC
CX₃CR1	TGGCACTTCCTGCAGAAGTTC	GGCCTCAGCAGAATCGTCATA
GAPDH	AGAAACCCTGGACCACCCA	CTCCCTCACAATTTCCATCCC
RNA 18s	GAGAAACGGCTACCACATCC	GGGTCGGGAGTGGGTAAT
β-actina	GGCTCCTAGCACCATGAAGA	CCACCGATCCACACAGAGTA

Tabla M1: Cebadores utilizados para los análisis de expresión génica mediante qRT-PCR.

Anticuerpos:

Antígeno	Anticuerpo	Dilución	Procedencia
Arginasa-1	Anti-mouse arginase1	IH: 1/100	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ
B220	Anti-mouse B220-Pacific Blue	FC: 1/200	Biolegend, San Diego, CA
B220(b)	Anti-mouse B220-biotin	Depleción Dynabeads	Beckman Coulter, Indianapolis, IN
cAMP	Anti-cyclic AMP	WB: 1µg/ml	Abcam, Cambridge, Reino Unido
Caspasa-3-activa	Anti-mouse caspase-3-cleaved	IH: 1/400	Cell Signaling, Danvers, MA
CD11b	Anti-mouse CD11b-biotin	FC: 1/100	Beckman Coulter
CD11c	Anti-mouse CD11c	IH: 1/50	Caltag Labs, Buckingham, Reino Unido
CD21	Anti-mouse-CD21-FITC	FC: 1/100	BD Pharmingen, San Diego, CA
CD23	Anti-mouse-CD23-PE	FC: 1/100	BD Pharmingen
CD3	Anti-human CD3	IH: 1/50	Dako, Glostrup, Dinamarca
CD3-IHC	Anti-mouse CD3 for IHQ	IH: 1/50	BD Pharmingen
CD3(b)	Anti-mouse CD3-APC-eFluor780	FC: 1/50	eBioscience, San Diego, CA
CD3(c)	Anti-mouse CD3-FITC	FC: 1/100	Beckman Coulter
CD31	Anti-mouse CD31 (MEC 13.3)	IC: 1/200	BD Biosciences, San José, CA
CD4	Anti-mouse CD4-PE	FC: 1/100	Beckman Coulter
CD44	Anti-mouse CD44-SPRD	FC: 1/100	Beckman Coulter
CD45	Anti-mouse CD45-PE	FC: 1/50	Southern Biotech, Birmingham, AL

CD45R/B220	Anti-mouse CD45R	IH: 1/50	BD Pharmingen
CD62L	Anti-mouse CD62L-FITC	FC: 1/100	Southern Biotech
CD8	Anti-mouse CD8-eFluor450	FC: 1/100	eBioscience
CXCR3	Anti-mouse CXCR3-PE	FC: 1/100	R&D Systems, Minneapolis, MN
ER-TR7	Anti-mouse ER-TR7	IH: 1/200	BMA Biomedicals, Augst, Suiza
F4/80	Anti-mouse F4/80	IC: 1/400	AbD Serotec, Kidlington, Reino Unido
Foxp3	Anti-mouse Foxp3-FITC	IH: 1/50	eBioscience
gp38	Anti-mouse podoplanin/gp38	IH, IC: 1/50	eBioscience
Gr1	Anti-mouse Gr1-biotin	Depleción Dynabeads	Beckman Coulter
Gr1(b)	Anti-mouse Gr1-PerCPCy5.5	FC: 1/100	BD Pharmingen
IgD	Anti-mouse IgD-Alexa647	FC: 1/100	Biolegend
IgG de ratón	Anti-mouse IgG1k	IH: 1/500	eBioscience
IgM	Anti-mouse IgM-PeCy7	FC: 1/100	eBioscience
iNOS	Anti-mouse iNOS	IH: 1/100	Upstate/Millipore, Billerica, MA
Ki67	Anti-mouse Ki67	IH: 1/50	Master Diagnostica, Granada, España
Ly6C	Anti-mouse Ly6C-FITC	FC: 1/200	Beckman Coulter
Mac-3	Anti-mouse Lamp2/Mac-3 (clon M3/84)	IH: 1/50	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA
MOMA-1	Anti-mouse metallophilic macrophages-	IH: 1/1250	Acris Antibodies, Herford, Alemania

p110 δ	Anti-p110 δ	IH: 1/500	Abcam
RANKL	Anti-mouse TRANCE/RANKL	IH: 1/50	eBioscience
SIGNR1	Anti-mouse SIGNR1	IH: 1/50	BD Pharmingen
Thy1.2	Anti-mouse CD90.2/Thy1.2	IH: 1/50	BD Pharmingen
α -5 integrina	Anti-mouse CD49e	IH: 1/100	AbD Serotec
α SMA	Anti-smooth muscle actin alpha	IH: 1/300	Abcam
β -actina	anti β -actina (clon AC-15)	WB: 1/5000	Sigma, St. Louis, MO

Anticuerpos secundarios:

Anticuerpo	Clase	Aplicación	Procedencia
Anti-conejo-Alexa488	Policlonal Cabra	IH, IC: 1/200	Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA
Anti-hamster IgG-Cy3	Policlonal Cabra	IH, IC: 1/400	Molecular Probes/Invitrogen
Anti-rata IgG-Alexa647	Policlonal Cabra	IH, IC: 1/200	Molecular Probes/Invitrogen
Anti-rata-Alexa488	Policlonal Cabra	IH, IC: 1/200	Molecular Probes/Invitrogen
Anti-rata-Alexa546	Policlonal Cabra	IH, IC: 1/200	Molecular Probes/Invitrogen
Anti-ratón IgG-Cy5	Policlonal Cabra	IH: 1/400	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA

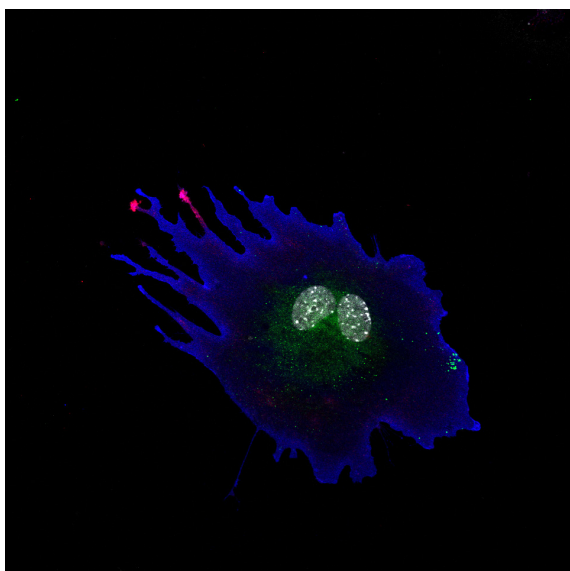
Otros marcadores:

Marcador	Reactivo	Aplicación	Procedencia
ADN	DAPI	IH, IC: 1/300	Molecular Probes/Invitrogen
Anticuerpos biotinilados	Avidina-EF450	FC: 1/200	eBioscience
Anticuerpos biotinilados	Estreptavidina-Cy5	IH: 1/1000	Jackson Immunoresearch

Tabla M2: Anticuerpos y marcadores utilizados. IH: Inmunohistoquímica; IC: Inmunocitoquímica; WB: *western blot*; FC: Citometría de flujo.

Para que pueda surgir lo posible es preciso intentar una y otra vez lo imposible.

Hermann Hesse



RESULTADOS

IMPLICACIÓN DE p110 δ PI3K EN LA DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES DE LOS ÓRGANOS LINFÓIDES SECUNDARIOS

Se ha descrito que las células estromales de los órganos linfoides secundarios participan activamente en la elaboración de la respuesta inmune (Mueller & Ahmed, 2008; Fletcher et al., 2010; Lukacs-Kornek & Turley, 2011). Dicha función es llevada a cabo mediante la formación de redes estromales que sirven de soporte para el desplazamiento de los linfocitos y para el anclaje de las células presentadoras de antígenos; igualmente, sirven de vía para el transporte de los antígenos pequeños (Mebius & Kraal, 2005; Mueller & Germain, 2009). Además de esa función más estructural, también secretan una serie de citoquinas y quimioquinas y expresan moléculas de adhesión que atraen a los linfocitos hacia determinadas áreas dentro de los SLO favoreciendo la correcta segregación de las células linfoides en los mismos y su supervivencia (Luther et al., 2000; Link et al., 2007; Mueller & Ahmed, 2008). Por todo ello, y teniendo en cuenta la relación de p110 δ con la existencia de anomalías estructurales en los SLO, especialmente en el bazo (Okkenhaug et al., 2002; Clayton et al., 2002; Jou et al., 2002), se planteó en el presente estudio analizar la relación de p110 δ con las células estromales de los SLO.

Estudio de la distribución de las células del sistema inmune en la zona marginal del bazo de los ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$

Los órganos linfoides secundarios de los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ presentan defectos estructurales (Okkenhaug et al., 2002). Dichos defectos afectan, entre otras, a la zona marginal, una región crucial para el desarrollo de una respuesta inmune correcta frente a antígenos que llegan por la vía sanguínea (revisado en Mebius & Kraal, 2005).

Se analizó la distribución de varios tipos celulares del bazo mediante inmunofluorescencia de secciones histológicas congeladas procedentes de ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$. La zona marginal de los bazos de los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ aparece claramente desorganizada (Figura R1). Algunos de los tipos celulares cuya distribución se ve afectada son los macrófagos metalofílicos de la zona marginal (MMM), las células B de la zona marginal (MZB) (Figura R1A, izquierda) y los macrófagos de la zona marginal (MZM) (Figura R1B, izquierda). Se cuantificaron esas diferencias para los MMM (MOMA-1⁺) y para los MZM (SIGNR1⁺) con el plugin *Texture Measure* para ImageJ, que mide patrones texturales como la respuesta de la intensidad de la imagen a diferentes filtros de imagen para una determinada región seleccionada de los SLO (Haralick et al., 1973). Existen diferencias en la textura de los MMM y de los MZM entre los bazos procedentes de ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y de p110 $\delta^{D910A/D910A}$ (Figura R1C). Las MZB también aparecen muy disminuidas en los bazos de los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ comparados con los de los ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ (Figura R1A), como se ha descrito con anterioridad (Durand et al., 2009). Se cuantificaron estas diferencias como la presencia/ausencia de MZB en cada folículo linfóide de los bazos analizados, considerando como MZB las células B220⁺

que aparecen rodeando por fuera al anillo positivo para el marcador MOMA-1 (MMM) (Figura R1C).

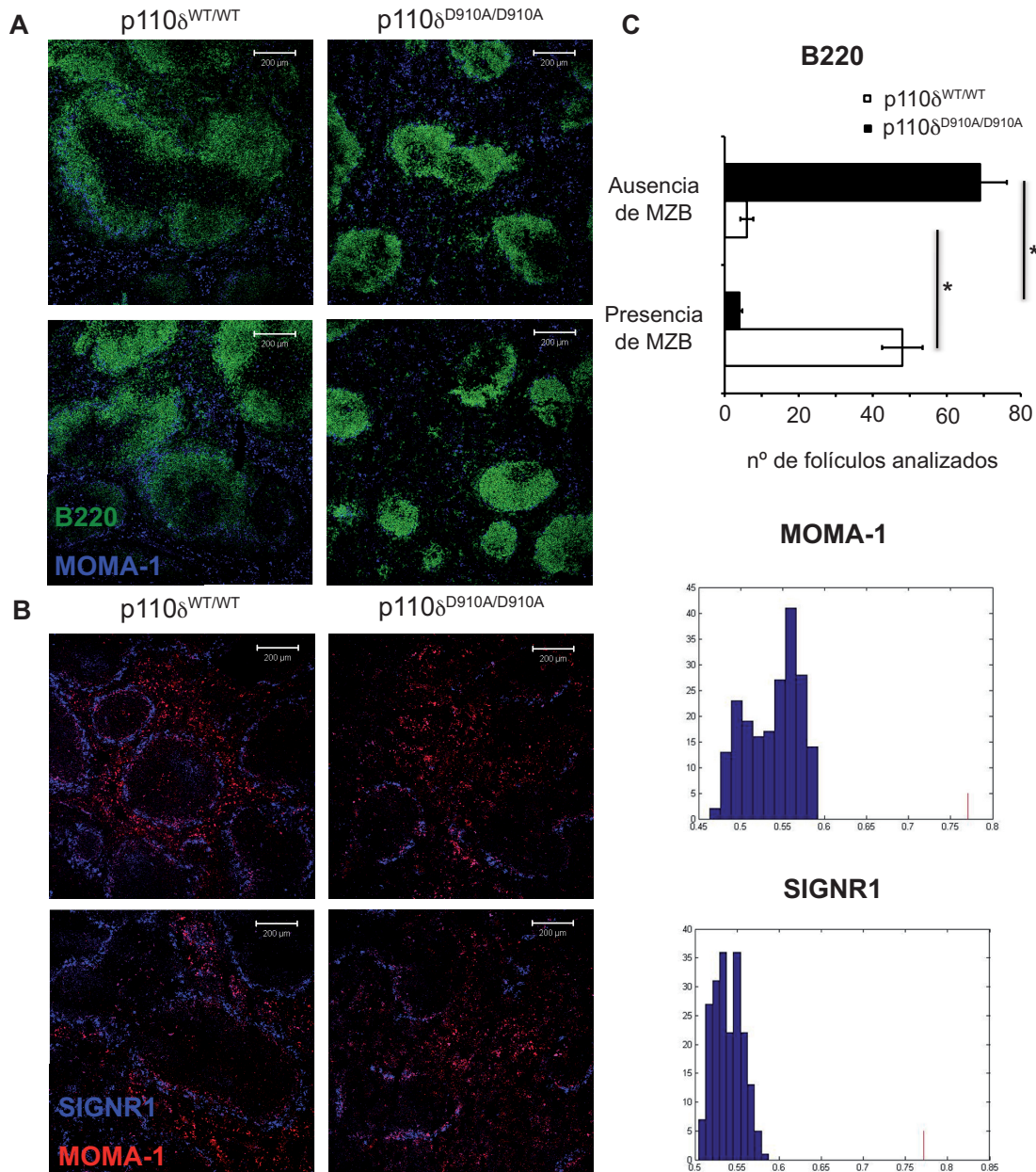


Figura R1. Distribución de las células inmunes en la zona marginal del bazo de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$. Se tiñeron mediante inmunofluorescencia secciones histológicas de bazo procedentes de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ para detectar tipos celulares inmunes de la zona marginal. **(A)** MZB (células B220⁺ que rodean el área MOMA-1⁺ alrededor de los folículos linfoides) y MMM (MOMA-1⁺) ($n = 4$ ratones/genotipo). **(B)** MZM (SIGNR1⁺) y MMM (MOMA-1⁺) ($n = 4$ ratones/genotipo). Barra = 200 μ m. Las gráficas que muestran las diferencias entre los genotipos figuran a la derecha **(C)**. Para las MZB (B220⁺), se cuantificó la presencia o ausencia de estas células en cada folículo linfóide ($n = 54$ folículos $p110\delta^{WT/WT}$, $n = 73$ folículos $p110\delta^{D910A/D910A}$); Media \pm SD, test T de Student, $p < 0.05$ y $p < 0.01$. La textura de los MMM y de los MZM se midió usando el plugin *Texture Measure* para ImageJ ($p = 0.005$).

Estos resultados coinciden con las anomalías previamente descritas e indican que la actividad catalítica de p110 δ podría estar implicada en la organización de la estructura del bazo; queda por determinar si también lo hace a través de una posible función en las células estromales de los órganos linfoides secundarios.

Ensayos de reconstitución con médula ósea en homeostasis y tras estimulación antigénica

Para determinar si los defectos estructurales de los órganos linfoides secundarios de los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ (Okkenhaug et al., 2002), (Figura R1) se deben únicamente a anomalías en sus poblaciones linfoides o también a defectos en sus células estromales, se realizaron ensayos de reconstitución en ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$ y se analizaron sus SLO en condiciones de homeostasis. Se reconstituyeron ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$ irradiados letalmente con médula ósea total de ratones donantes p110 $\delta^{WT/WT}$ o p110 $\delta^{D910A/D910A}$. Seis semanas después de la reconstitución, se sacrificaron los ratones y se extrajeron el bazo y los nódulos linfáticos para analizar en ellos, mediante inmunofluorescencia de secciones histológicas, las poblaciones principales de células linfoides. También se analizaron los números totales de células de dichos órganos así como sus poblaciones linfoides mediante citometría de flujo.

Se realizaron estudios similares en condiciones de estimulación antigénica, para analizar si los defectos estructurales encontrados en los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ en condiciones de homeostasis se corregían tras la estimulación antigénica. Se utilizó *Candida albicans* inactivada por calor, ya que se ha descrito que genera a la vez una respuesta inmune local y sistémica (Rosati et al., 1995; Scaringi et al., 1995), lo que permite el estudio simultáneo de la respuesta en bazo y en LN (Figura M1A, B).

Análisis de las poblaciones linfoides mediante inmunofluorescencia y medida de los folículos linfoides del bazo

El estudio de la distribución de las poblaciones linfoides en el bazo y en los LN de los ratones reconstituidos (Figura R2A, B) revela que el patrón de distribución de las células B (B220⁺), las células T (CD3⁺ o Thy1.2⁺), los MMM (MOMA-1⁺) y las células dendríticas (DC; CD11c⁺) se conserva en los SLO de los ratones receptores, independientemente de que se reconstituyan con médula p110 $\delta^{WT/WT}$ o p110 $\delta^{D910A/D910A}$ (Figura R2A, bazo; R2B, LN). El área de los folículos linfoides del bazo de los ratones receptores p110 $\delta^{WT/WT}$ reconstituidos con uno u otro tipo de médula es muy similar al de los ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ sin reconstituir y, de forma análoga, el área de los folículos del bazo de los ratones receptores p110 $\delta^{D910A/D910A}$ reconstituidos con médula p110 $\delta^{WT/WT}$ o p110 $\delta^{D910A/D910A}$ se parece a la de los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ sin reconstituir (Figura R2C). De este modo, el fenotipo del ratón receptor permanece, sin importar que la reconstitución se realice con médula procedente de ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ o p110 $\delta^{D910A/D910A}$.

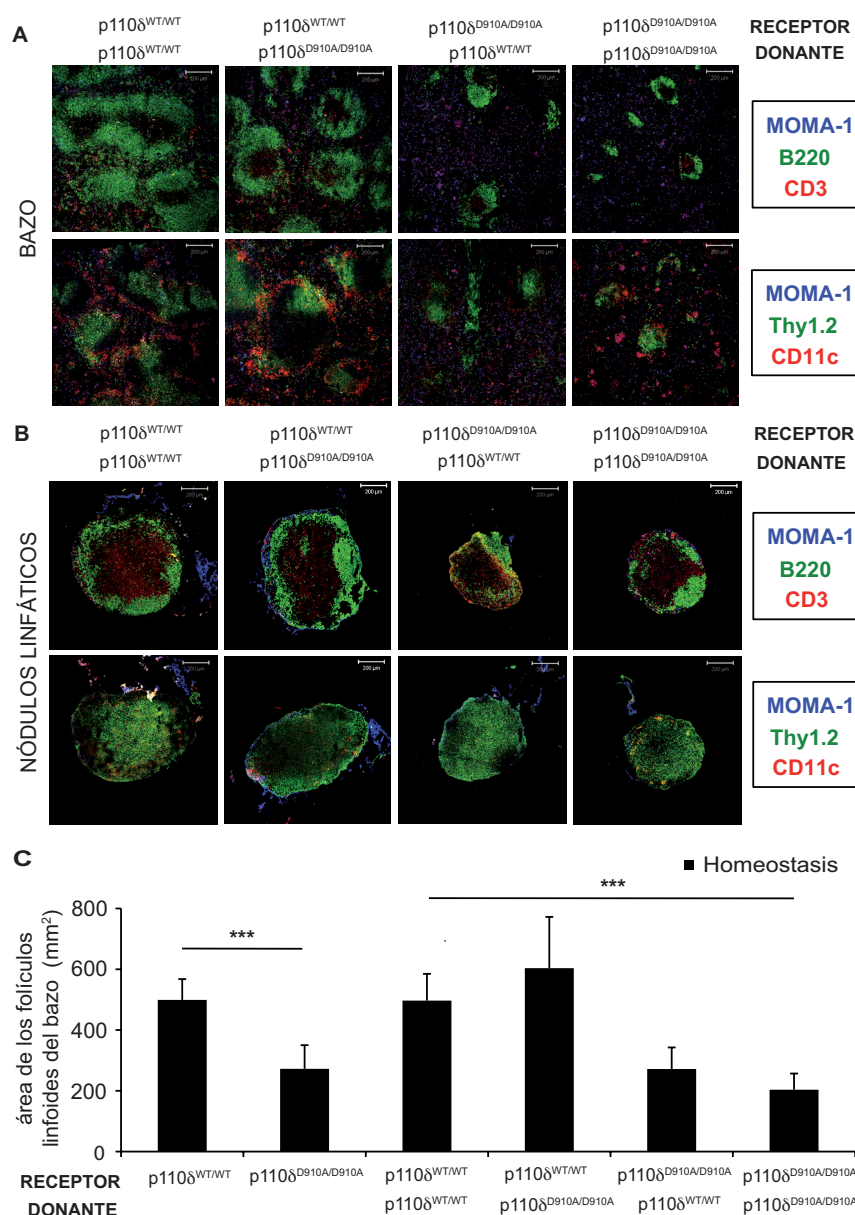


Figura R2. Análisis de la distribución de las células linfoides y medida del área de los folículos linfoides en los órganos linfoides secundarios de ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$ tras los ensayos de reconstitución. Se tiñeron secciones congeladas de bazo y LN procedentes de ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$ reconstituídos y sin reconstituir para detectar mediante inmunofluorescencia las poblaciones de células T (Thy1.2⁺, CD3⁺), células B (B220⁺), MMM (MOMA-1⁺) y DC (CD11c⁺) en **(A)** secciones de bazo y **(B)** secciones de LN para todas las condiciones de reconstitución estudiadas ($n = 4-6$ ratones/condición). Barra = 200 μ m. **(C)** Se midió el área de los folículos linfoides de bazo para cada condición de la reconstitución tras la tinción de cortes congelados con hematoxilina-eosina y la cuantificación con el software ImageJ. Media \pm SD; Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0.001$.

Estos resultados sugieren que las células estromales de los SLO podrían tener un efecto en la distribución y en la correcta localización de las células del sistema inmune en los mismos, y que este efecto sería dependiente de la actividad catalítica de p110 δ

Estudio del número total de células de los órganos linfoides secundarios y de la respuesta tipo T CD4⁺ a *C. albicans* inactivada por calor

Se inyectó *C. albicans* inactivada por calor a los ratones seis semanas después de la reconstitución, y se sacrificaron cinco días después. Se contó el número total de células del bazo y de los LN de los ratones reconstituidos y sin reconstituir en homeostasis y tras estimulación antigénica para confirmar la eficacia de la reconstitución (Figuras R3A y R4A). Se analizó también el número total de células T CD4⁺ en los SLO procedentes de los ratones de las condiciones mencionadas (Figuras R3B y R4B).

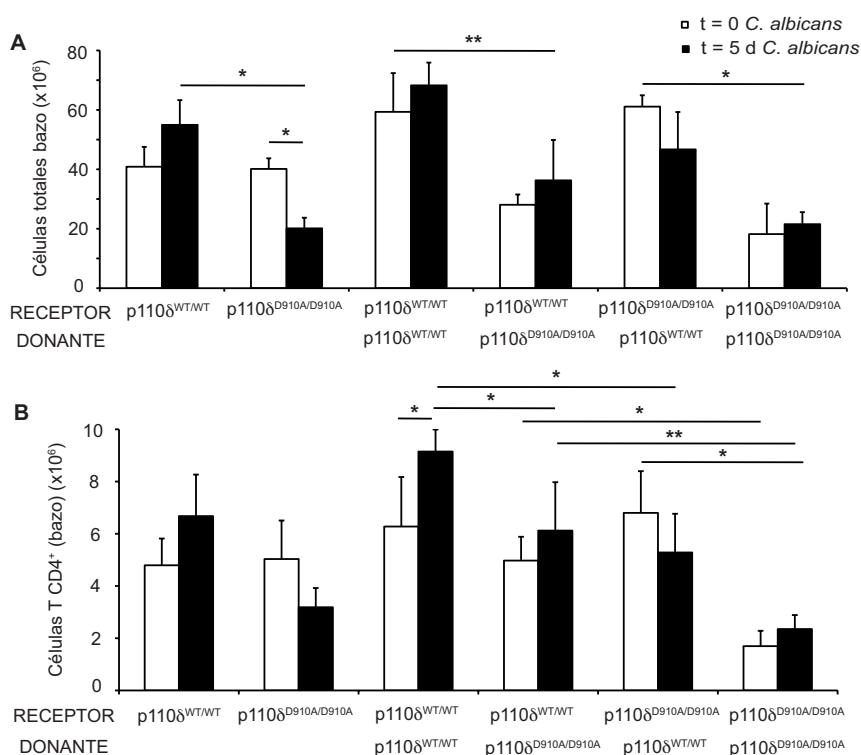


Figura R3. Recuento del número de células totales y de células T CD4⁺ en los bazos de los ratones p110δ^{WT/WT} y p110δ^{D910A/D910A} en homeostasis y tras estimulación antigénica después de la reconstitución. Se extrajeron los bazos para cada condición estudiada (ratones p110δ^{WT/WT} y p110δ^{D910A/D910A} reconstituidos y sin reconstituir) en condiciones de homeostasis y de estimulación antigénica (cinco días tras inyectarles *C. albicans*). Se prepararon suspensiones celulares de bazo y se contó el número total de células por órgano (A). También se tiñeron dichas suspensiones con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 para determinar el número de células T CD4⁺ mediante citometría de flujo (B) (n = 2-4 ratones/condición). Media ± SD; test T de Student, p<0.05 y p<0.01.

Los números totales de células en los bazos de los ratones p110δ^{WT/WT} sin reconstituir aumentan tras la estimulación antigénica, pero no lo hacen en los bazos procedentes de los ratones p110δ^{D910A/D910A} (Figura R3A). El número de células T CD4⁺ en los bazos de los ratones p110δ^{WT/WT} sin reconstituir aumentan a su vez tras la estimulación antigénica, pero no en los bazos de los ratones p110δ^{D910A/D910A} (Figura R3B), sugiriendo

que la expansión de las células T CD4⁺ en los bazo de los ratones p110^ΔD910A/D910A es defectuosa. Los ratones de ambos genotipos reconstituidos con médula p110^ΔD910A/D910A muestran una reducción en el número total de células del bazo (Figura R3A), dando idea de que la reconstitución no ha sido completa en estos casos. El número de células totales y de células T CD4⁺ en el bazo aumenta tras la estimulación antigénica si se compara con la condición de homeostasis en los ratones p110^{WT/WT} pero no así en los ratones p110^ΔD910A/D910A (Figura R3A, B). Estos resultados indican que las células estromales de los bazo p110^ΔD910A/D910A podrían no estar contribuyendo a la correcta expansión de las células T CD4⁺ en respuesta a *C. albicans* inactivada por calor.

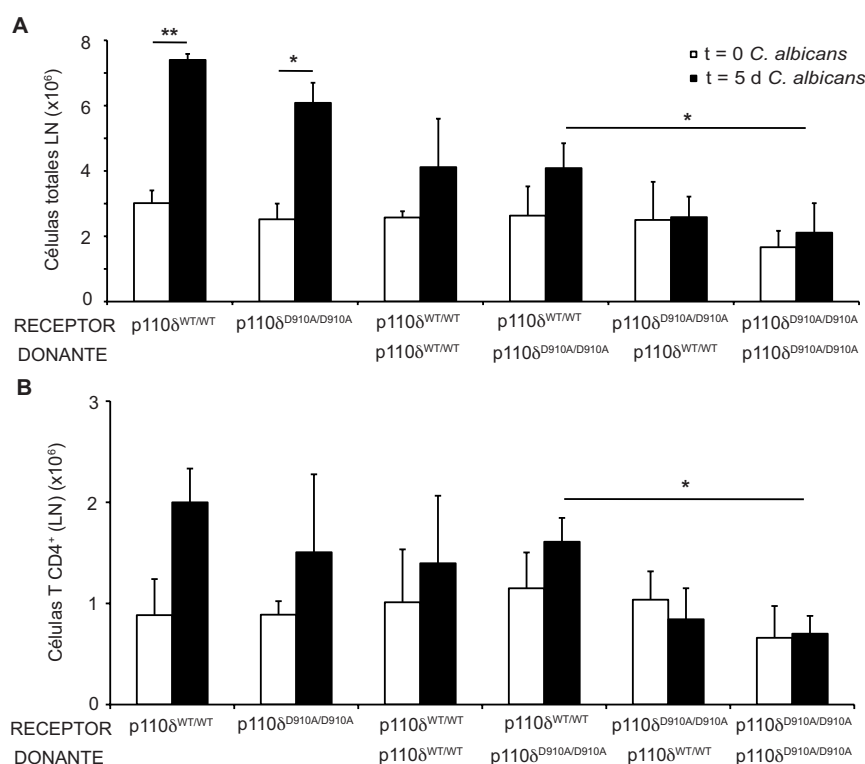


Figura R4. Recuento del número de células totales y de células T CD4⁺ en los nódulos linfáticos de los ratones p110^ΔWT/WT y p110^ΔD910A/D910A en homeostasis y tras estimulación antigénica después de la reconstitución. Se extrajeron los LN para cada condición estudiada como en la Figura R3. Se contaron las suspensiones celulares para determinar el número total de células por órgano (A) y se tiñeron para definir el número de células T CD4⁺ mediante citometría de flujo (B) (n = 2-4 ratones/condición). Media ± SD; test T de Student, p<0.05 y p<0.01.

Los nódulos linfáticos de los ratones p110^ΔWT/WT y p110^ΔD910A/D910A sin reconstituir muestran un aumento en el número total de células tras la estimulación antigénica, siendo menor en los ratones p110^ΔD910A/D910A que en los p110^ΔWT/WT (Figura R4A). Un aumento similar se observa en las células T CD4⁺ totales de los nódulos linfáticos (Figura R4B), lo que indica que los nódulos linfáticos de los ratones p110^ΔWT/WT y p110^ΔD910A/D910A estarían

respondiendo a la estimulación con *C. albicans*, aunque la respuesta es algo menor en los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ que en los $p110\delta^{WT/WT}$. Tras la reconstitución, el número total de células de los LN tiende a aumentar tras la estimulación antigénica en los ratones $p110\delta^{WT/WT}$, pero no en los receptores $p110\delta^{D910A/D910A}$ (Figura R4A). Los resultados son similares para las células T $CD4^+$, sugiriendo que el estroma de los nódulos linfáticos podría estar implicado en la respuesta de tipo T $CD4^+$, y que $p110\delta$ podría contribuir a esta función estromal, aunque en menor medida que en el bazo.

Estudio del número total de células T de memoria en los órganos linfoides secundarios de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$

Se ha descrito que la actividad catalítica de $p110\delta$ es necesaria para la correcta expansión de las células T tras el primer encuentro con el antígeno (Liu et al., 2009) así como para el desarrollo de la respuesta de memoria (Liu & Uzonna, 2010). CD44 es una proteína de superficie celular necesaria para la extravasación de los linfocitos a los sitios de inflamación. El aumento de su expresión ($CD44^{alto}$) se utiliza como un marcador de la activación previa de la célula T y, por ello, se usa como marcador de memoria inmunológica (DeGrendele et al., 1997). CD62L es un receptor implicado en la correcta distribución y migración de los linfocitos a los LN, les permite entrar a través de las HEV y su expresión disminuye ($CD62L^{bajo}$) tras la activación de las células T (Andersson et al., 1994). En el presente estudio, se analizó la respuesta primaria tras la estimulación con *C. albicans* para detectar la expansión de células T $CD4^+$, pero también se determinó el número total de células T $CD4^+$ de memoria ($CD44^{alto}$), células T $CD4^+$ de memoria central ($CD44^{alto}CD62L^{alto}$) y células T $CD4^+$ de memoria efectora ($CD44^{alto}CD62L^{bajo}$) en el bazo y en los LN de ratones sin reconstituir, en condiciones de homeostasis y de estimulación antigénica (Figura R5).

Los subtipos estudiados de células T de memoria en bazo no se ven alterados por la ausencia de actividad catalítica $p110\delta$ en condiciones de homeostasis. Sin embargo, tras estimulación antigénica con *C. albicans* inactivada por calor, muestran una tendencia a aumentar en los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ mientras que en los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ incluso disminuyen (Figura R5A). En los LN, sin embargo, todos los subtipos de células T de memoria están disminuidos en los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ comparados con los $p110\delta^{WT/WT}$ en condiciones de homeostasis y, tras estimulación antigénica, aumentan en número incluso en los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ aunque la respuesta es menor en estos últimos comparados con los $p110\delta^{WT/WT}$ (Figura R5B).

Estos resultados parecen coincidir con estudios previos (Liu & Uzonna, 2010) en la disminución de las células T de memoria de los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ y también nos dan idea de la mayor afectación de los bazos en comparación con los LN de los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ en cuanto a la elaboración de la respuesta inmune dependiente de células T.

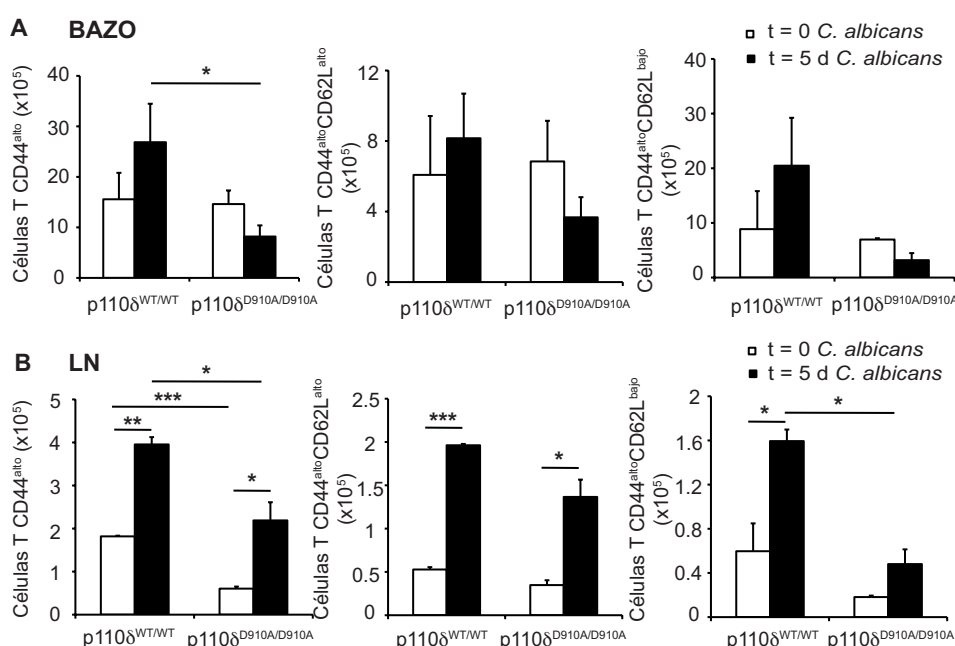


Figura R5. Recuento del número de células T activadas y de memoria en bazo y en nódulos linfáticos de los ratones p110δ^{WT/WT} y p110δ^{D910A/D910A}. Se extrajeron el bazo y los LN de ratones p110δ^{WT/WT} y p110δ^{D910A/D910A} en condiciones de homeostasis y de estimulación antigénica (cinco días tras inyectarles *C. albicans*). Se prepararon suspensiones celulares de bazo y LN y se tiñeron con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD44 y anti-CD62L para determinar el número total de células T activadas (CD44^{alto}) así como de memoria central (CD44^{alto}CD62L^{alto}) y de memoria efectora (CD44^{alto}CD62L^{bajo}) en bazo (A) y en LN (B) mediante citometría de flujo ($n = 2-4$ ratones/condición). Media \pm SD; test T de Student, $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$.

Estudio del número total de células B y de células B de la zona marginal del bazo de los ratones p110δ^{WT/WT} y p110δ^{D910A/D910A}

Se ha relacionado en numerosas ocasiones p110δ con el correcto desarrollo y funcionalidad de las células B (Clayton et al., 2002; Jou et al., 2002; Okkenhaug et al., 2002; Durand et al., 2009). Las MZB constituyen un subtipo de células B localizadas en la zona marginal, alrededor y entre los MMM y MZM, y cuya presencia influye en la correcta distribución de los citados macrófagos en un bucle de retroalimentación positivo en el que dichos macrófagos también contribuyen a que las MZB estén correctamente distribuidas en la zona marginal del bazo (Karlsson et al., 2003; Nolte et al., 2004). Las MZB tienen un papel en la respuesta inmune innata ya que pueden, bien diferenciarse a células plasmáticas productoras de IgM, o bien funcionar como APC para los linfocitos de la pulpa blanca (Lopes-Carvalho & Kearney, 2004). Estudios previos han descrito la afectación de las MZB en los ratones p110δ^{D910A/D910A} (Durand et al., 2009).

En concreto, en el presente trabajo se analizaron los números totales de células B (B220⁺) y de MZB (B220⁺IgM^{bajo}IgD^{alto}CD21^{alto}CD23^{bajo}) mediante citometría de flujo

en los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ reconstituidos y sin reconstituir así como en condiciones de homeostasis y de estimulación antigénica (Figura R6). Se observa que el número total de células B en los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ sin reconstituir es menor que en los $p110\delta^{WT/WT}$. Además, después de la reconstitución, se observa que los ratones reconstituidos con médula $p110\delta^{D910A/D910A}$ presentan números menores de células B que los ratones reconstituidos con médula $p110\delta^{WT/WT}$ (Figura R6A). Sin embargo, la reconstitución no llega a ser total en los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ reconstituidos con médula $p110\delta^{WT/WT}$, con lo que el estroma también podría estar contribuyendo a la correcta llegada de células B al bazo (Figura R6A). La estimulación con *C. albicans* no parece aumentar de manera significativa el número de células B totales en ninguna de las condiciones estudiadas (Figura R6A).

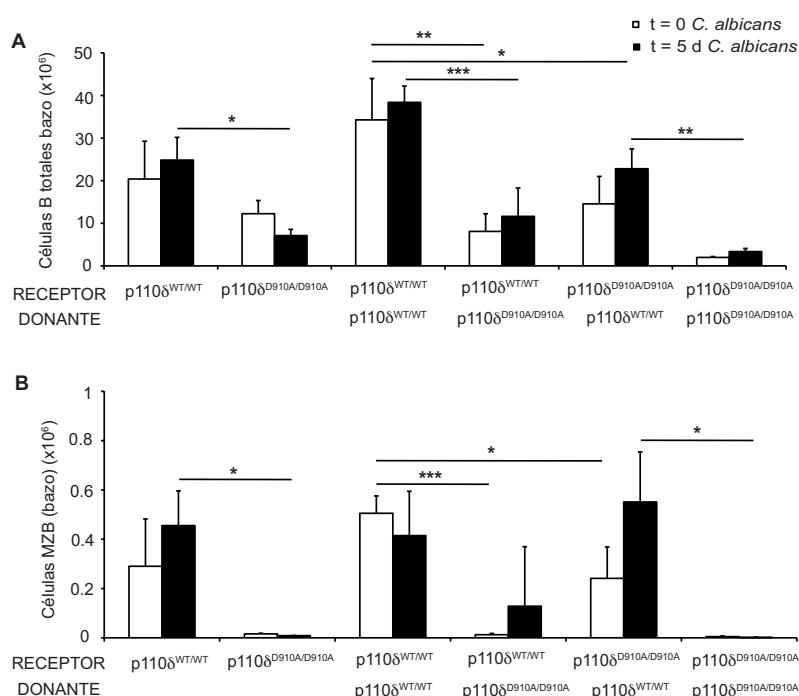


Figura R6. Recuento del número de células B totales y de células B de la zona marginal en los bazos de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ en homeostasis y tras estimulación antigénica después de la reconstitución. Se extrajeron los bazos para cada condición estudiada como en la Figura R3. Se prepararon suspensiones celulares de bazo y se tiñeron dichas suspensiones con anticuerpo anti-B220 para determinar el número total de células B del bazo (A) y con anti-IgM, anti-IgD, anti-CD21 y anti-CD23 para determinar el número de MZB mediante citometría de flujo (B) ($n = 2-4$ ratones/condición). Media \pm SD; test T de Student, $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$.

En cuanto a las MZB, el defecto observado en los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ es más drástico, casi aparecen ausentes en los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ y en aquéllos irradiados y reconstituidos con médula $p110\delta^{D910A/D910A}$ (Figura R6B). Este defecto parece ser intrínseco a las propias células hematopoyéticas $p110\delta^{D910A/D910A}$ con que se reconstituye, aunque cabe destacar que en los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ reconstituidos con médula $p110\delta^{D910A/D910A}$,

y que por tanto no presentan casi MZB, tras la estimulación antigénica se produce un cierto aumento en el número de MZB, que estaría mediado por la correcta actividad del estroma $p110\delta^{WT/WT}$ (Figura R6B). Estos resultados indican lo ya descrito referente a la necesaria actividad de $p110\delta$ en las células B para su correcta funcionalidad y además apoyan la idea de que el estroma del bazo ejerce una función en la elaboración de la respuesta inmune, y que esta función estaría mediada, por lo menos en parte, por la actividad catalítica de $p110\delta$.

Análisis de las poblaciones específicas de células estromales de los órganos linfoides secundarios de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$

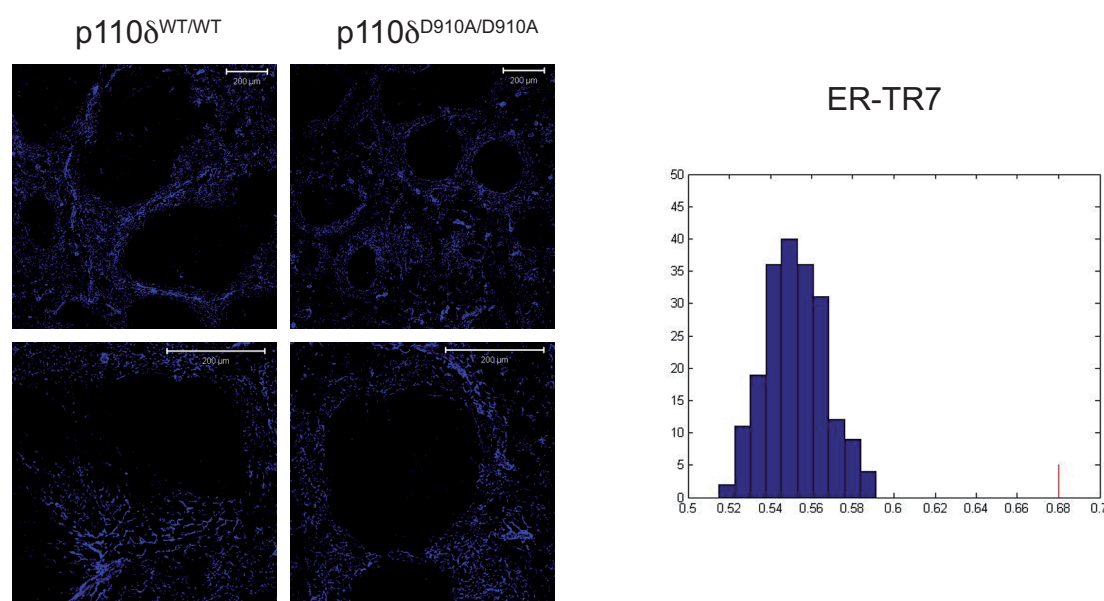


Figura R7. Análisis del estroma general del bazo en los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$. Se tiñeron mediante inmunofluorescencia secciones de bazo de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ para detectar ER-TR7, marcador de estroma que se expresa en más de un tipo de células estromales ($n = 3$ ratones/genotipo). Barra = 200 μm . La textura estromal se midió usando el plugin *Texture Measure* para ImageJ ($p = 0.005$); la gráfica que muestra las diferencias entre los dos genotipos figura a la derecha.

Para evaluar qué poblaciones estromales estarían afectadas por la ausencia de actividad catalítica $p110\delta$, se llevaron a cabo tinciones de inmunofluorescencia de cortes histológicos de bazo y nódulos linfáticos procedentes de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$. Se utilizó en primer lugar un marcador general de estroma, ER-TR7 (Mueller & Germain, 2009), para determinar la afectación general del estroma del bazo en ausencia de actividad catalítica $p110\delta$ (Figura R7). Se emplearon también marcadores específicos de poblaciones estromales como α -5 integrina para los fibroblastos de la pulpa roja (RPF) (Mueller & Germain, 2009), RANKL para las células reticulares marginales (MRC) de la zona marginal (Mueller & Germain, 2009; Katakai, 2012), y gp38 para las células reticulares fibroblásticas (FRC) de la zona T (Mueller & Germain, 2009; Farr et al., 1992).

(Figura R8A, B y C, respectivamente). Se analizó la textura estromal con el plugin *Texture Measure* para ImageJ, que mide patrones texturales como la respuesta de la intensidad de la imagen estromal a diferentes filtros de imagen para una determinada región seleccionada de SLO procedente ratones $p110^{\delta WT/WT}$ o $p110^{\delta D910A/D910A}$ (Haralick et al., 1973).

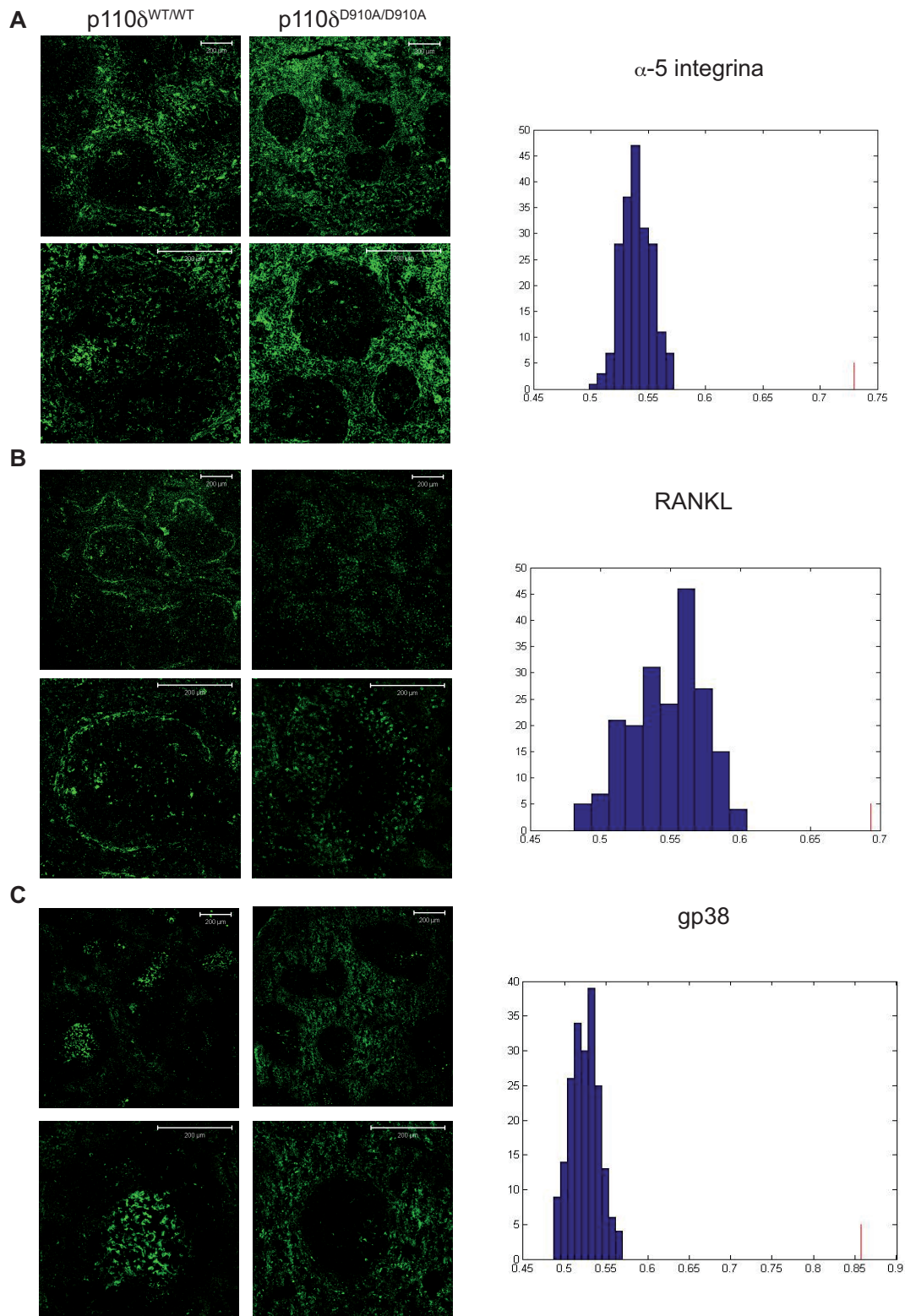


Figura R8. Análisis de poblaciones específicas de células estromales del bazo de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$. Se tiñeron mediante inmunofluorescencia secciones de bazo de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ para detectar marcadores de células estromales **(A)** α -5 integrina para los fibroblastos de la pulpa roja ($n = 5$ ratones/genotipo), **(B)** RANKL para las células reticulares marginales (MRC) de la zona marginal ($n = 4$ ratones/genotipo) y **(C)** gp38 para las células reticulares fibroblásticas (FRC) de la zona T ($n = 3$ ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $n = 4$ ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$). Barra = 200 μ m. La textura estromal se midió usando el plugin *Texture Measure* para ImageJ ($p = 0.005$); las gráficas que muestran las diferencias entre los genotipos figuran a la derecha.

El estroma general del bazo presenta una textura diferente en los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ comparados con los $p110\delta^{D910A/D910A}$ (Figura R7). En cuanto a los subtipos más específicos de células estromales, existen diferencias en los patrones texturales entre los bazos $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ para todos los subtipos de células estromales analizados (Figura R8), siendo las mayores para las FRC de la zona T (Figura R8C).

Al ser las FRC la población de células estromales más afectada en bazo, se analizó su textura (de forma análoga a lo realizado en bazo) en nódulos linfáticos de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ para determinar si en estos órganos también se hallaban alteradas. Las células gp38⁺ de los LN procedentes de ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ muestran una textura diferente que las de los LN procedentes de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ (Figura R9). Sin embargo, esa diferencia es menor que la que se observa en los bazos

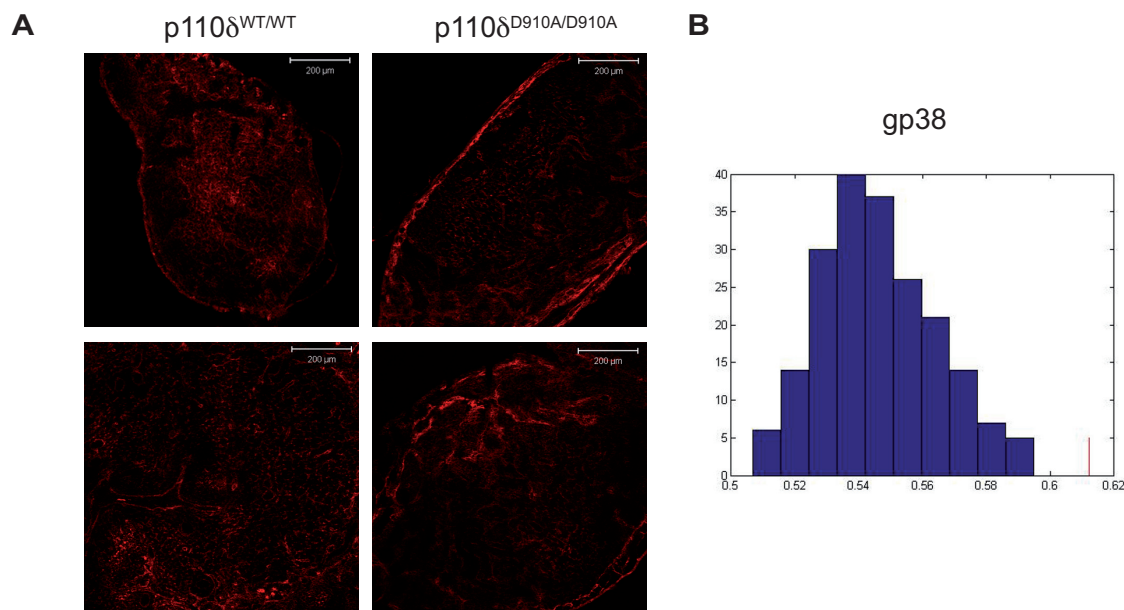


Figura R9. Análisis de la población de células estromales gp38⁺ en los nódulos linfáticos de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$. Se tiñeron mediante inmunofluorescencia secciones de LN de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ para detectar las células estromales gp38⁺ (FRC) de la zona de células T ($n = 3$ ratones/genotipo). La textura estromal se midió con el plugin *Texture Measure* para ImageJ ($p = 0.005$); la gráfica que muestra las diferencias entre los genotipos se encuentra a la derecha.

(Figura R8C). Estos resultados apoyan la hipótesis de la afectación de la organización estromal de los SLO en ausencia de actividad catalítica p110 δ . Sin embargo, la expresión de esta isoforma de PI3K aún no ha sido descrita en estos tipos celulares específicos.

Estudio de la expresión de p110 δ en las células estromales de bazo y nódulos linfáticos

Para determinar si p110 δ se expresa en las células estromales de los SLO, el objetivo que se persiguió fue su tinción en FRC (población estromal más afectada por la ausencia de actividad catalítica p110 δ (Figura R8C)) en cultivo y en cortes histológicos de bazo y LN. El aislamiento de números suficientes de células estromales altamente purificadas para llevar a cabo análisis como la qRT-PCR o el *western blot* es complicado. Por ello, se cultivaron las células estromales y se utilizó la inmunofluorescencia para detectar p110 δ así como los marcadores estromales gp38 y CD31, que permiten diferenciar entre cuatro subtipos de células estromales de los SLO (gp38⁺CD31⁻ FRC, gp38⁺CD31⁺ LEC, gp38⁻CD31⁺ VEC y gp38⁻CD31⁻) (Fletcher et al., 2011). La tinción de F4/80 se utilizó para eliminar del recuento a los macrófagos contaminantes presentes en el cultivo estromal.

Los análisis de inmunofluorescencia para detectar la expresión de p110 δ en secciones de bazo y de LN muestran que todas las células gp38⁺ expresan p110 δ (Figura R10A, B). También aparece tinción p110 δ ⁺ en todas las células estromales gp38⁺ en cultivo procedentes del bazo y de los LN de los ratones p110 δ ^{WT/WT} (Figura R10C, D). De este modo, p110 δ se expresa no sólo en las células hematopoyéticas sino también en las poblaciones estromales gp38⁺ de los SLO, incluyendo las FRC (gp38⁺CD31⁻) del bazo y de los LN así como las células endoteliales linfáticas (gp38⁺CD31⁺) (LEC) (Figura R10C, D). Las LEC constituyen un subtipo estromal que conforma los vasos linfáticos aferentes de los LN, implicado además en la modulación de la respuesta inmune dependiente de las células T (Lukacs-Kornek et al., 2011). p110 δ se localiza mayoritariamente en las células estromales rodeando al núcleo, aunque también aparece, con menor intensidad, en el interior del mismo (Figura R10C). Existen trabajos previos que describen la actividad de p110 δ en el núcleo de los macrófagos y de líneas celulares de cáncer tras la activación del receptor del M-CSF (M-CSFR) nuclear (Zwaenepoel et al., 2012). También se ha descrito la localización citoplasmática de p110 δ , coincidiendo con las vesículas del aparato de Golgi, también en BMM y en líneas celulares de macrófagos (Low et al., 2010).

Estos resultados concuerdan con la afectación descrita de las células estromales en los ratones p110 δ ^{D910A/D910A} e indican la expresión de esta isoforma de PI3K en las células estromales no hematopoyéticas de los SLO. Quedaría, sin embargo, por determinar qué papel tiene la actividad catalítica p110 δ en estos tipos celulares y a qué nivel afectaría a su funcionalidad y a su correcta distribución en los SLO.

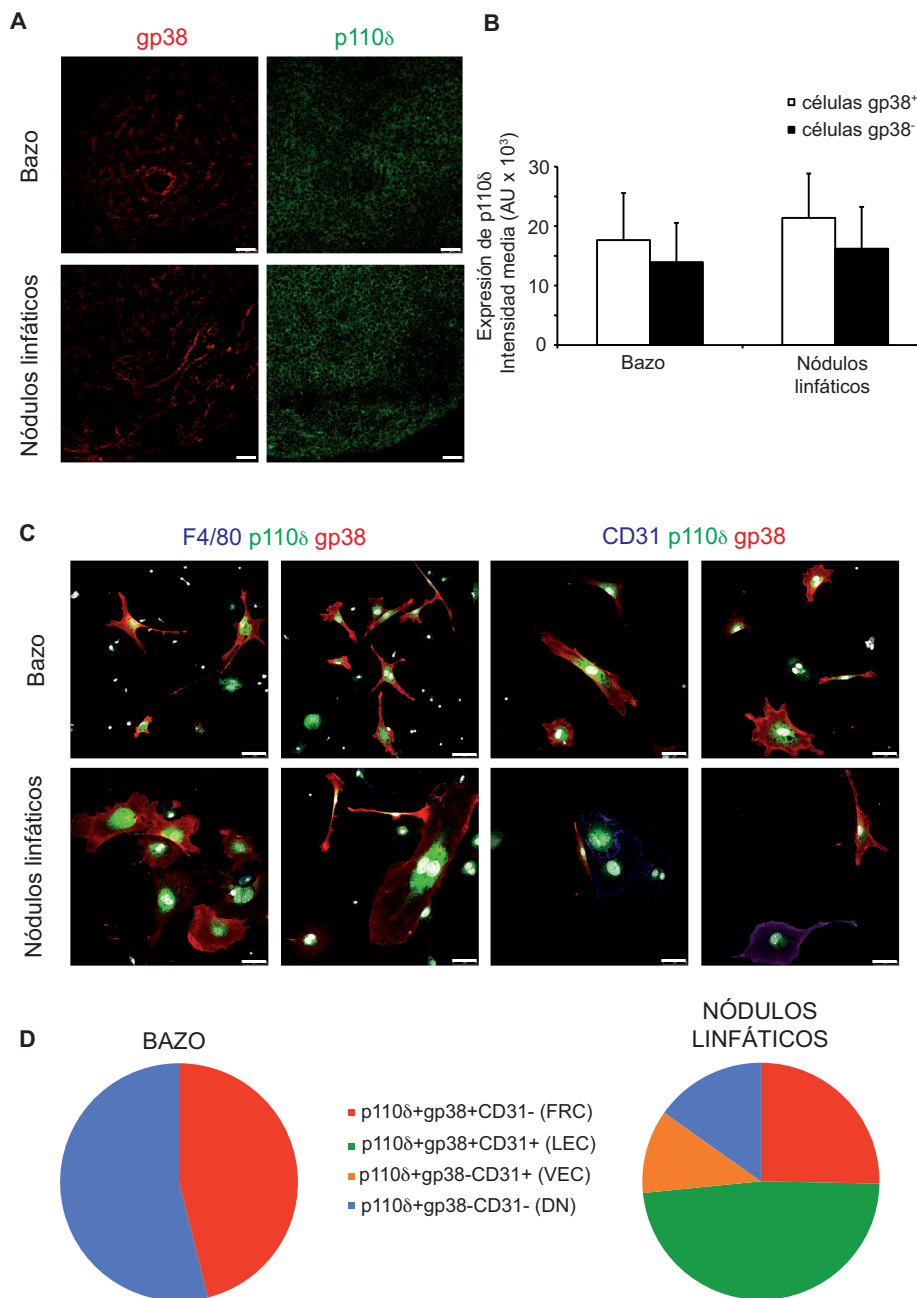


Figura R10. p110δ se expresa en las células estromales del bazo y de los nódulos linfáticos de los ratones p110δ^{WT/WT}. (A) Secciones histológicas de bazo y LN de ratones p110δ^{WT/WT} se tiñeron mediante inmunofluorescencia para detectar p110δ y gp38 ($n = 6-7$ ratones). Barra = 50 μm. (B) La tinción de inmunofluorescencia de las células estromales del bazo y de los LN de los ratones p110δ^{WT/WT} se cuantificó mediante ImageJ para determinar la intensidad del marcaje p110δ⁺ en las células gp38⁺ frente a las gp38⁻. (C) Células estromales en cultivo procedentes del bazo y de los LN de los ratones p110δ^{WT/WT} se tiñeron mediante inmunofluorescencia para detectar p110δ, gp38 y F4/80 o CD31 ($n = 5$ experimentos para células estromales de bazo y $n = 3$ experimentos para células estromales de los LN). Barra = 50 μm. (D) La inmunofluorescencia de las células estromales en cultivo se cuantificó mediante ImageJ con el objetivo de determinar la fracción de cada subtipo de células estromales p110δ⁺ presente en el bazo y en los nódulos linfáticos.

Análisis mediante qRT-PCR de la expresión de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento en los órganos linfoides secundarios de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$

Para estudiar la función de $p110\delta$ en las células estromales de los SLO, se seleccionó un grupo de genes ligados a los efectos de las células estromales de los SLO en la función inmune para determinar su expresión en el bazo y en los LN de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$. Dado que las FRC secretan CCL19 y CCL21, quimioquinas implicadas en la migración de las células T y de algunos tipos de DC a los SLO (Luther et al., 2000; Gunn et al., 1999; Chan et al., 1999), se utilizó la qRT-PCR para analizar su expresión en extractos totales de RNA de bazo y de LN. Estas quimioquinas también están implicadas en la correcta organización de los MZM en la zona marginal del bazo (Ato et al., 2004). CXCL13 es necesaria para la correcta migración y distribución de las células B y de algunos subtipos de DC en los folículos B de los SLO (Cyster et al., 2000). La expresión de los receptores para las citadas quimioquinas (CCR7 para CCL19 y CCL21 y CXCR5 para CXCL13) también se analizó ya que su presencia en la superficie de las células T y DC (CCR7) y de las células B y DC (CXCR5), es necesaria para la migración de estas células en los SLO (Gunn et al., 1998b; Gunn et al., 1998a; Forster et al., 2008). Además, las $LT\alpha$ y $LT\beta$ y el $TNF\alpha$ expresados por las LTi también contribuyen al mantenimiento de la estructura de los SLO en los adultos (Kim, 2008). La unión de $LT\alpha 1\beta 2$ a su receptor $LT\beta R$ en las MRC (análogos de las LTo fetales) inicia la cascada de señalización que dará lugar a la secreción de CXCL13 (Katakai et al., 2008). Por todo ello, se analizó la expresión de CCL19, CCL21, CXCL13, CCR7, CXCR5, $LT\alpha$, $LT\beta$, $LT\beta R$ y $TNF\alpha$ en extractos de RNA total del bazo y de los LN procedentes de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$.

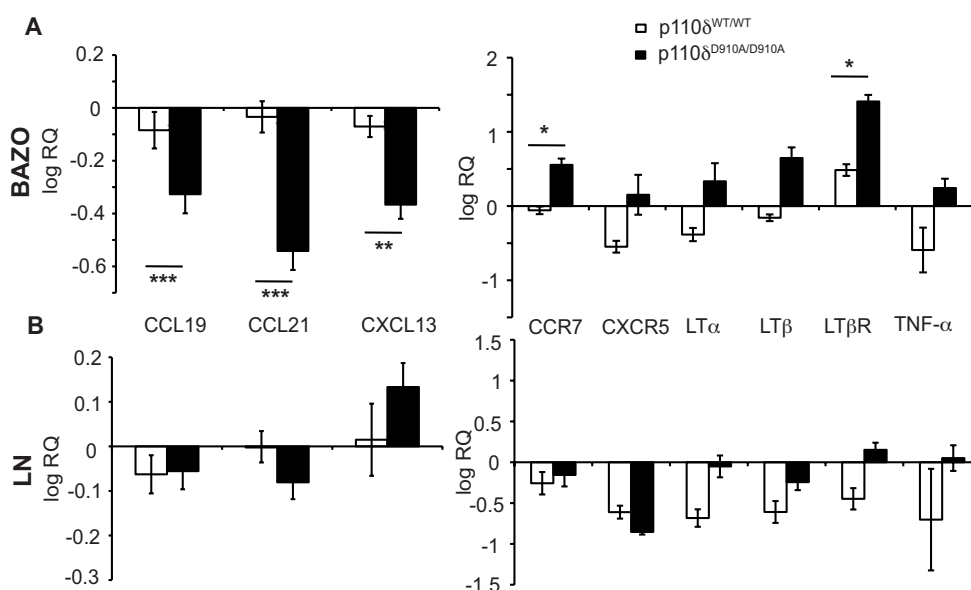


Figura R11. Análisis de la expresión de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento en los órganos linfoides secundarios de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ mediante qRT-PCR. El RNA total se extrajo del bazo y de los LN de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$ ($n = 5$ ratones/genotipo). Se analizó la expresión de CCL19, CCL21, CXCL13, CCR7, CXCR5, $LT\alpha$, $LT\beta$, $LT\beta R$ y $TNF-\alpha$ en bazo (A) y LN (B). Se muestra la media \pm SD del $\log 2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada genotipo. RQ = $2^{-\Delta\Delta Ct}$. T de Student, ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$).

La expresión de CCL19, CCL21 y de CXCL13 es menor en los bazos procedentes de ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ que en los bazos de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ (Figura R11A), mientras que no se observan diferencias en los LN (Figura R11B). La expresión de CCR7, CXCR5, $LT\alpha$, $LT\beta$, $LT\beta R$ y $TNF\alpha$ no muestra diferencias entre los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y los $p110\delta^{D910A/D910A}$ en LN (Figura R11B), mientras que la expresión de CCR7 y la de $LT\beta R$ es mayor en los bazos procedentes de los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ que en los bazos $p110\delta^{WT/WT}$ (Figura R11A). La menor expresión de CCL19, CCL21 y CXCL13 en los bazos $p110\delta^{D910A/D910A}$, plantea la posibilidad de que las células estromales del bazo de los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ pudieran secretar menos quimioquinas implicadas en la migración y correcta localización de los linfocitos en los SLO que las de los bazos $p110\delta^{WT/WT}$, influyendo así en la distribución de los linfocitos y, por lo tanto, en la función de los SLO.

IMPLICACIÓN DE p110 γ PI3K EN LA PROLIFERACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS EN LAS LESIONES ATEROSCLERÓTICAS

Se sabe que la isoforma de PI3K p110 γ controla la activación y la migración de las células T, de los neutrófilos y de los monocitos/macrófagos (Vanhaesebroeck et al., 2005; Sasaki et al., 2000; Martin et al., 2008; Reif et al., 2004; Guillermet-Guibert et al., 2008; Oak et al., 2007). La hipótesis de partida para el desarrollo de esta parte del trabajo fue que la delección de p110 γ podría contribuir al menor desarrollo de la aterosclerosis mediante el control de la funcionalidad y de la infiltración de las células T y de los monocitos/macrófagos. Existen trabajos previos que relacionan a p110 γ con el menor desarrollo de la aterosclerosis, en concreto con la infiltración celular en las lesiones y el tamaño de las mismas (Chang et al., 2007; Fougerat et al., 2008). Sin embargo, el mecanismo que subyace en esta relación no ha sido completamente definido. En el presente estudio se analiza el papel de p110 γ en procesos como la apoptosis, la proliferación de los macrófagos en las lesiones o la diferenciación de dichos macrófagos hacia los fenotipos M1 o M2.

La falta de p110 γ en los ratones LDLR^{-/-} reduce el tamaño de las lesiones ateroscleróticas pero no afecta a la captación de LDL acetilado por los macrófagos

Para determinar el efecto de la delección de p110 γ PI3K en la apoptosis así como en la proliferación y polarización de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas, se generaron ratones deficientes en uno (LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-}) o los dos alelos de p110 γ (LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-}). Ratones de ambos genotipos se alimentaron con dieta rica en grasa durante dos meses para inducir la enfermedad. Los niveles totales en suero de colesterol, colesterol-HDL, colesterol-LDL y triglicéridos se midieron antes y después del tratamiento con dieta grasa. También se midió el área de la lesión en secciones de seno aórtico procedentes de ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} teñidas con hematoxilina/eosina para determinar en qué medida la ausencia de p110 γ afecta al desarrollo de la aterosclerosis. Por otro lado, las células espumosas cargadas de lípidos constituyen el principal tipo celular en las lesiones de aterosclerosis (Moore & Tabas, 2011). Se comprobó la capacidad de los macrófagos peritoneales procedentes de los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} para convertirse en células espumosas tras su incubación con partículas de LDL acetilado-Alexa488. Con ello, se buscó determinar si la ausencia de p110 γ afecta a la capacidad de captación de LDL modificado por parte de los macrófagos de las lesiones.

La dieta rica en colesterol aumenta los niveles de colesterol total, colesterol-LDL y triglicéridos de manera similar en los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} para todos los tiempos estudiados (Figura R12A). Por otro lado, el tamaño de las lesiones es menor en los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} que en los LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} (Figura R12B, C). Por último, los análisis realizados mediante citometría de flujo para determinar la capacidad de captación de acLDL-Alexa488 por los macrófagos peritoneales de los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}

p110 γ ^{-/-}, no revelan diferencias en la mediana de la intensidad de fluorescencia emitida por el fluoróforo Alexa488 entre los dos genotipos estudiados (Figura R12D).

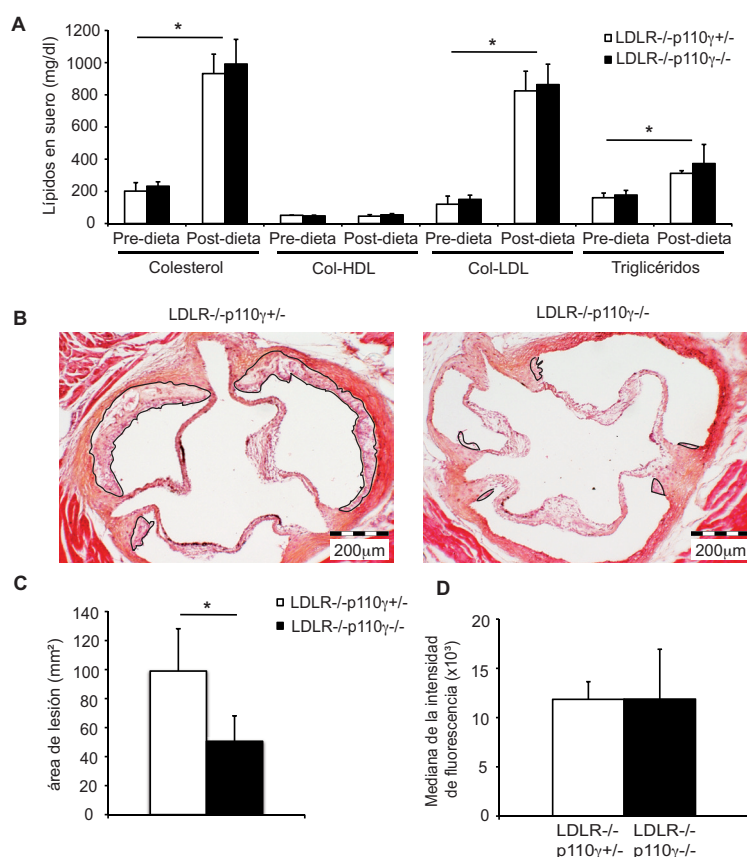


Figura R12. Los ratones deficientes en LDLR y en PI3K p110 γ muestran lesiones ateroscleróticas menores que los ratones control. El desarrollo de las lesiones se estudió en ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} después (t = 2 meses) del tratamiento con dieta rica en grasa. **(A)** El colesterol total, el colesterol-HDL, el colesterol-LDL y los triglicéridos se midieron en el suero de estos ratones (t = 0, n = 10 ratones/genotipo; t = 2 meses, n = 4 ratones/genotipo). Media \pm SD; test T de Student, p<0.05. **(B)** Se muestran fotos representativas de tinciones de hematoxilina-eosina de secciones del seno aórtico procedentes de ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-}. El área de lesión aparece delimitada. Barra = 200 μ m. **(C)** Análisis cuantitativo del tamaño de lesión en el seno aórtico de ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} (n = 6) y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} (n = 5) llevado a cabo mediante ImageJ. Media \pm SD; test T de Student, p<0.05. **(D)** Se cultivaron macrófagos peritoneales de ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} (n = 5) y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} (n = 6) con LDL acetilado conjugado con Alexa488 (LDLac-Alexa488). La intensidad de fluorescencia se midió mediante citometría de flujo. La captura del LDLac-Alexa488 por los macrófagos peritoneales se analizó y cuantificó comparando las medianas de la intensidad de fluorescencia. Mediana \pm SD; test T de Student.

Estos resultados avalan el uso del modelo de ratón LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} como apropiado para el estudio de la aterosclerosis ya que, tras dos meses de dieta grasa, los niveles lipídicos en suero aumentan de manera similar en los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y en los LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} (Figura R12A). Los resultados también apoyan que la ausencia de p110 γ en ratones propensos a desarrollar aterosclerosis alimentados con dieta rica en grasas,

favorece la aparición de placas de ateroma de menor tamaño que en los ratones con p110 γ presente (Chang et al., 2007; Fougerat et al., 2008) (Figura R12B, C). Además, parece que esta disminución en el tamaño de lesión no es consecuencia de la menor captación de LDL modificado por parte de los macrófagos LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{-/-}$ (Figura R12D).

La falta de p110 γ en los ratones LDLR $^{-/-}$ afecta a la infiltración celular en las placas de ateroma

La aterosclerosis se considera una alteración del metabolismo del colesterol que tiene como resultado la acumulación de lípidos y la infiltración de células del sistema inmune en la pared arterial (Galkina & Ley, 2009). Estas células inmunes (monocitos/macrófagos, células T, células T reguladoras, mastocitos, células dendríticas y neutrófilos), se acumulan preferentemente en la placa aterosclerótica y la mayoría de ellas contribuye a potenciar la inflamación (Lusis, 2000; Witztum & Palinski, 1999; Weber & Noels, 2011). Para evaluar la infiltración de los macrófagos, las células T y las células T reguladoras en situación de delección de p110 γ , se tiñeron secciones de seno aórtico de estos ratones con marcadores específicos para dichos tipos celulares (Mac-3, CD3 y Foxp3, respectivamente).

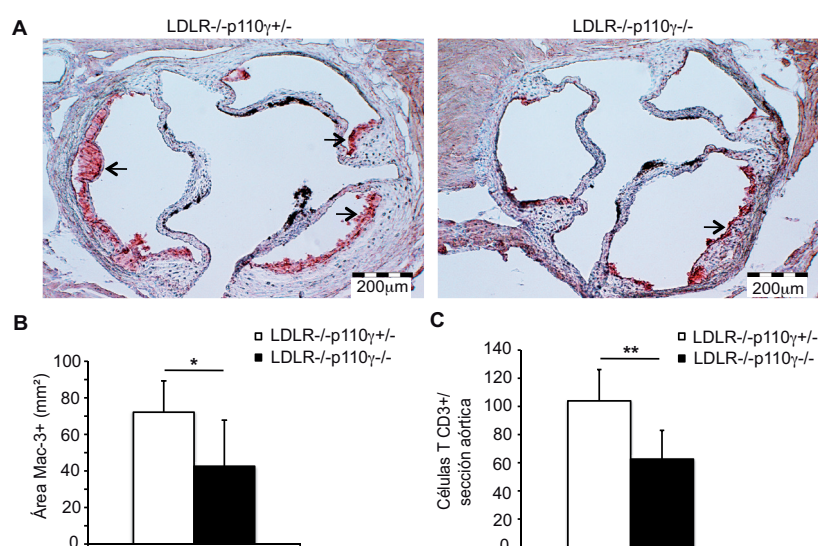


Figura R13. La infiltración de los macrófagos y de las células T es menor en las lesiones de los ratones LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{-/-}$ que en las de los ratones LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{+/-}$. Se estudiaron secciones de seno aórtico en ratones LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{+/-}$ (hembras, $n = 6$) y LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{-/-}$ ($n = 7$) tras dos meses de dieta rica en grasa. **(A)** Se tiñeron mediante inmunofluorescencia secciones de seno aórtico de dichos ratones para detectar infiltración de macrófagos (células Mac-3 $^{+}$). Barra = 200 μ m. Las flechas indican el área Mac-3 $^{+}$. **(B)** Análisis cuantitativo del área Mac-3 $^{+}$ por sección de seno aórtico realizado mediante ImageJ. Media \pm SD; T de Student, $p < 0.05$. **(C)** Cuantificación del número absoluto de células T CD3 $^{+}$ por sección de seno aórtico, realizada con ImageJ. Media \pm SD; Test de Poisson, $p < 0.01$.

Existe una disminución significativa en el área teñida por Mac-3 en los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} comparados con los LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} (Figura R13A, B). El número absoluto de células CD3⁺ también se reduce en las lesiones de los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} en comparación con las lesiones de los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} (Figura R13C). Las células Foxp3⁺ son extremadamente escasas en las lesiones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} y están ausentes en las LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} ($n = 8$ ratones/genotipo, Tabla R1). Estos resultados indican que, como se había descrito previamente (Fougerat et al., 2008), p110γ tiene un papel en la infiltración de las células T y de los monocitos en las lesiones de aterosclerosis, pudiendo ser ésta una de las causas de la disminución del tamaño de lesión en los ratones deficientes en p110γ, pero cuyo mecanismo no ha sido elucidado.

n° de células Foxp3 ⁺ /sección ($n = 3$ secciones/ratón)	LDLR ^{-/-} p110γ ^{+/-} (media ± SD)	LDLR ^{-/-} p110γ ^{-/-} (media ± SD)
Ratón 1	0 ± 0	0 ± 0
Ratón 2	0.667 ± 0.578	0 ± 0
Ratón 3	0.333 ± 0.578	0 ± 0
Ratón 4	0 ± 0	0 ± 0
Ratón 5	0 ± 0	0 ± 0
Ratón 6	0.333 ± 0.578	0 ± 0
Ratón 7	2.667 ± 0.578	0 ± 0
Ratón 8	0.667 ± 0.578	0 ± 0
Media del total de ratones	0.583 ± 0.886	0 ± 0

Tabla R1. Cuantificación de la infiltración de células T reguladoras Foxp3⁺ en las lesiones ateroscleróticas de los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110γ^{-/-}. Cuantificación del número absoluto de células Foxp3⁺ en cada sección de seno aórtico de los ratones indicados ($n = 8$ ratones/genotipo). Los resultados muestran la media ± SD.

La ausencia de p110γ no afecta a la expresión de CXCR3 en extractos de RNA de cayado aórtico ni en las células T CD4⁺ y CD8⁺

CXCR3 es el receptor para las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, y es un marcador de células Th1 activadas (Galkina & Ley, 2009). Para determinar si la menor infiltración de leucocitos en las lesiones de los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} se debe a una menor expresión del receptor CXCR3, que permite la quimiotaxis hacia CXCL9 y CXCL10 presentes en las lesiones (Xie et al., 2003; Zernecke et al., 2008), se estudió la expresión

de CXCR3 y de sus ligandos en extractos de RNA total de cayado aórtico y aorta torácica descendente, procedentes de ratones $LDLR^{-/-}p110\gamma^{+/-}$ y $LDLR^{-/-}p110\gamma^{-/-}$ alimentados durante dos meses con dieta rica en grasa. También, se purificaron células T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ a partir del bazo de ratones $p110\gamma^{+/-}$ y $p110\gamma^{-/-}$ y se midió la expresión en ellas de CXCR3 en condiciones basales.

Los resultados revelan que no existen diferencias en la expresión de CXCR3, CXCL9 y CXCL10 en las lesiones aórticas entre los ratones $LDLR^{-/-}p110\gamma^{+/-}$ y los $LDLR^{-/-}p110\gamma^{-/-}$ (Figura R14A). De acuerdo con esto, la falta de $p110\gamma$ tampoco afecta a la expresión de CXCR3 en las células T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ del bazo de ratones $p110\gamma^{+/-}$ y $p110\gamma^{-/-}$ en condiciones basales (Figura R14A, B). De estos resultados se puede deducir que la causa principal de la menor infiltración de leucocitos en las lesiones de los ratones deficientes en $p110\gamma$ no parece ser la menor expresión de CXCR3 o de sus ligandos en las placas de ateroma ni de CXCR3 en las células T de dichos ratones.

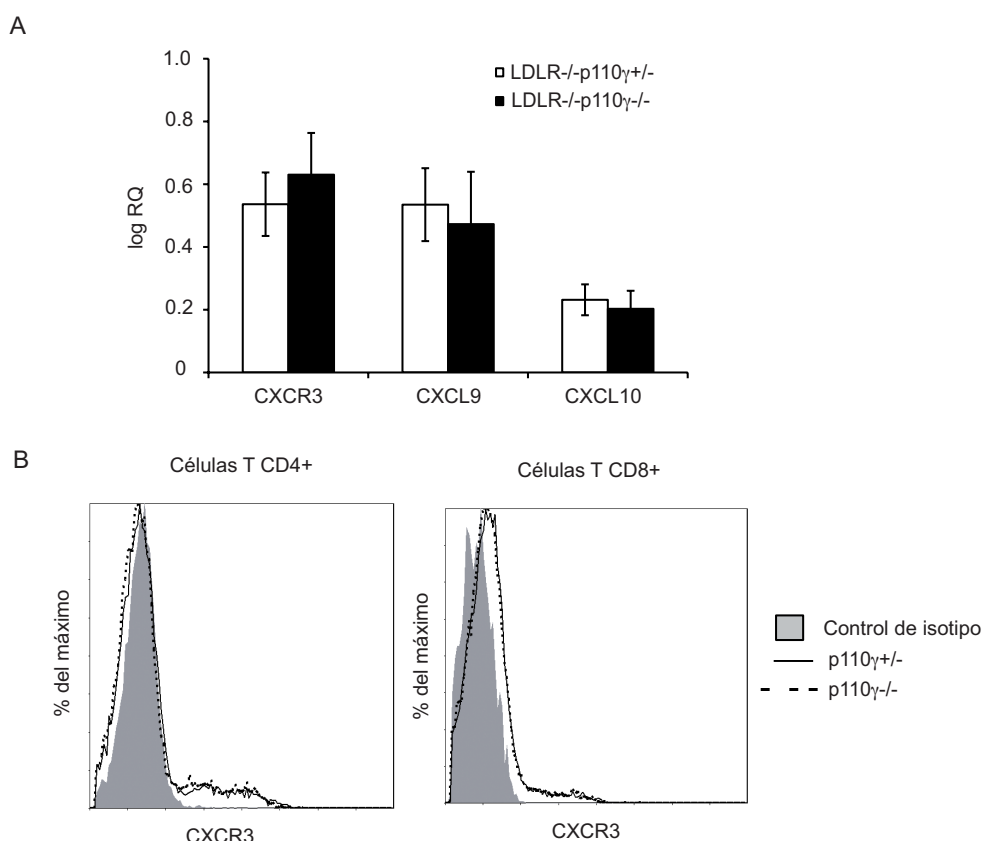


Figura R14. La deficiencia en $p110\gamma$ no afecta a la expresión de CXCR3 en extractos de RNA de cayado aórtico ni en células T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$. (A) Se extrajo RNA del cayado aórtico y de la aorta torácica descendente de ratones $LDLR^{-/-}p110\gamma^{+/-}$ y $LDLR^{-/-}p110\gamma^{-/-}$ tratados durante dos meses con dieta rica en grasa. Se analizaron los niveles de expresión de CXCR3, CXCL9 y CXCL10 mediante qRT-PCR ($n = 4$ ratones/genotipo). Se muestra la media \pm SD del $\log 2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada genotipo. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. (B) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de CXCR3 en células T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ procedentes de ratones $p110\gamma^{+/-}$ y $p110\gamma^{-/-}$ ($n = 6$ ratones/genotipo).

La ausencia de p110 γ no afecta a la expresión de CCR2, CCR5 ni CX₃CR1 en extractos de RNA de cayado aórtico y de aorta torácica descendente

CCR2, CCR5 y CX₃CR1 están presentes en las lesiones ateroscleróticas (Zernecke et al., 2008). CX₃CR1 se expresa en las lesiones en las células endoteliales, en las células espumosas y en las células de músculo liso de las arterias coronarias (Imai et al., 1997; Schulz et al., 2007; Barlic et al., 2007). La delección de CX₃CR1 en modelos murinos de aterosclerosis produce la reducción en el número de macrófagos presentes en las lesiones (Lesnik et al., 2003; Combadiere et al., 2003). CCR2 se expresa en los monocitos inflamatorios Ly6C^{alto}, subtipo más abundante en las lesiones ateroscleróticas, ya que tienen una mayor capacidad de infiltración en las mismas (Swirski et al., 2007). CCR5 se expresa en células presentes en las lesiones como los monocitos/macrófagos y los linfocitos T, y media la parada y la diapédesis transendotelial a través de la unión a CCL5 (Carvalho-Pinto et al., 2004). Además, la delección conjunta de CX₃CR1, CCR2 y CCR5 en ratones ApoE^{-/-} provoca una disminución de la aterosclerosis en un 90% (Combadiere et al., 2008). Por ello, se estudió la expresión de CCR2, CCR5 y CX₃CR1 en extractos de RNA total de cayado aórtico y aorta torácica descendente de ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} alimentados durante dos meses con dieta rica en grasa (Figura R15).

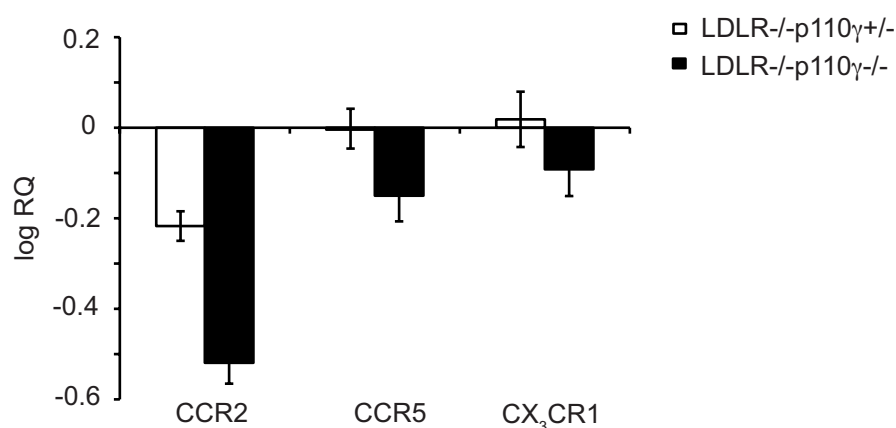


Figura R15. La deficiencia en p110 γ no afecta a la expresión de CCR2, CCR5 ni CX₃CR1 en extractos de RNA de cayado aórtico y aorta torácica descendente. Se extrajo RNA del cayado aórtico y de la aorta torácica descendente de ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} tratados durante dos meses con dieta rica en grasa. Se analizaron los niveles de expresión de CCR2, CCR5 y CX₃CR1 mediante qRT-PCR ($n = 4$ ratones/genotipo). Se muestra la media \pm SD del log 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} para cada genotipo. RQ = 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}.

Los resultados muestran que, a pesar de que se observa una tendencia hacia una menor expresión de CCR2, CCR5 y CX₃CR1 en los extractos procedentes de ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} comparada con los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-}, las diferencias que se aprecian no son significativas (Figura R15). De este modo, p110 γ no parece estar implicada en la señalización por debajo de estos receptores, como posible mecanismo de explicación para

el menor tamaño de las lesiones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} comparado con el de las lesiones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-}.

Estudio de las poblaciones circulantes en sangre periférica de ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} tras la administración de dieta rica en grasa

Los ratones deficientes en p110^γ no muestran diferencias en sus poblaciones circulantes salvo para los neutrófilos que son más abundantes en sangre en los ratones p110^γ^{-/-} que en los p110^γ^{+/-} (Hirsch et al., 2000). Para asegurarnos de que las poblaciones de sangre periférica no estaban afectadas en los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} comparadas con las de los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-}, se analizaron los porcentajes de distintas poblaciones linfoides (células T (CD3⁺), granulocitos (Gr1⁺) y monocitos inflamatorios (Ly6C^{alto})) en sangre periférica procedente de ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} antes y después de dos meses de tratamiento con dieta grasa (Figura R16).

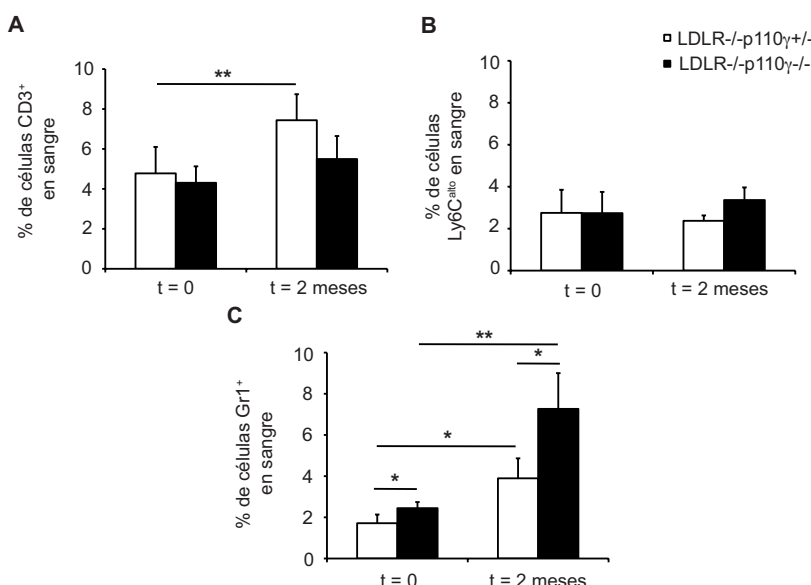


Figura R16. Estudio de las poblaciones linfoides en sangre periférica de los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-}. Se extrajo sangre periférica total de los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} antes (t = 0) y después (t = 2 meses) de ser tratados durante dos meses con dieta rica en grasa. Se realizaron tinciones para detectar células T (CD3⁺) (A), monocitos inflamatorios (Ly6C^{alto}) (B) y granulocitos (Gr1⁺) (C) mediante citometría de flujo (n = 7-10 ratones/genotipo, t = 0; n = 4 ratones/genotipo, t = 2 meses). Media ± SD, Test T de Student, p<0.05 y p<0.01.

Se observa que no hay diferencias entre los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} y los LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} en el porcentaje de células T ni de monocitos inflamatorios ni a tiempo cero ni pasados dos meses de dieta grasa (Figura R16A, B). Sin embargo, el porcentaje de granulocitos en sangre es mayor en los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} que en los LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} para los dos tiempos analizados (Figura R16C).

Estos resultados parecen indicar que la disminución de la infiltración de macrófagos y de células T en las lesiones de los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} no se debe a que haya un porcentaje menor de estas poblaciones en sangre periférica, sino a una menor capacidad de infiltración de los citados tipos celulares de los ratones deficientes en p110^γ, como ya se ha descrito (Fougerat et al., 2008).

La deficiencia en p110^γ PI3K provoca la disminución de la proliferación de los macrófagos pero no así la de las células T en las lesiones ateroscleróticas

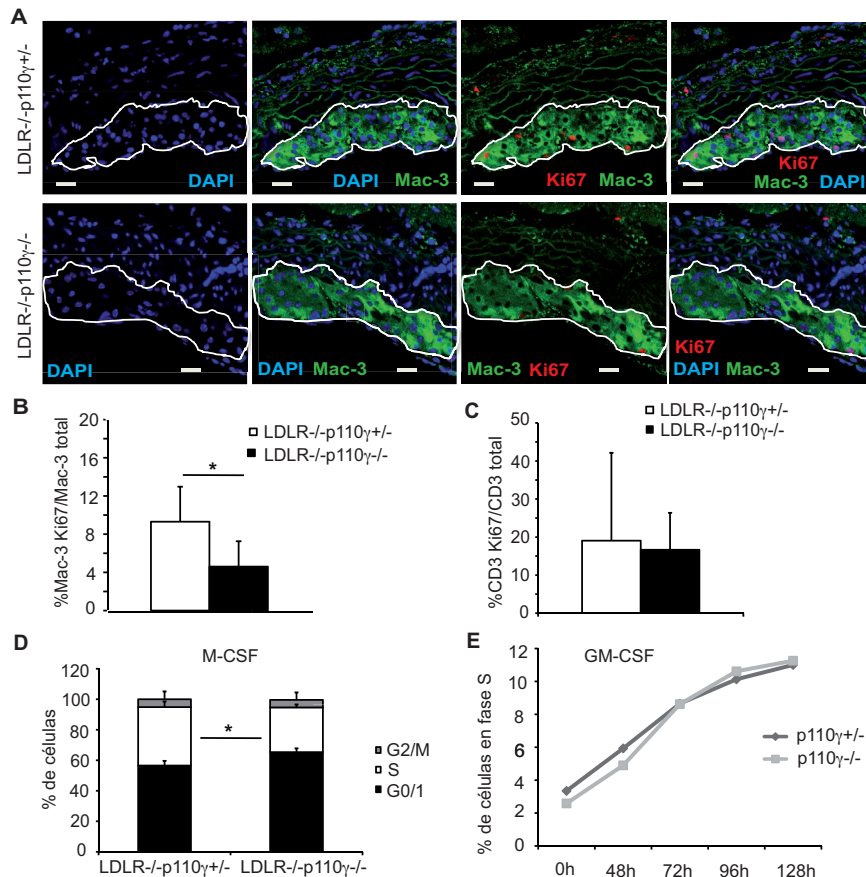


Figura R17. La proliferación de los macrófagos disminuye en los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} mientras que la proliferación de las células T no se ve afectada. Se estudiaron las placas de ateroma de los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/+} (n = 5) y LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} (n = 6) después de dos meses de tratamiento con dieta rica en grasa. **(A)** Se muestran imágenes representativas de la tinción de inmunofluorescencia para detectar la proliferación de los macrófagos en las secciones de seno aórtico. Barra = 30 μm. **(B)** Representación gráfica del porcentaje de los macrófagos proliferantes relativos al total de macrófagos en el área de lesión. Media ± SD, Test T de Student, p<0.05. **(C)** Porcentaje de células T proliferantes en relación al número total de células T en el área de lesión, cuantificado con el software ImageJ. Media ± SD. **(D)** Representación del porcentaje de macrófagos derivados de médula ósea (BMM) de ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/+} y LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} en las fases del ciclo celular G2/M, S y G0/G1 después de 26 h de estimulación con M-CSF (n = 3 experimentos, cada uno con un pool de 3 ratones/genotipo). Media ± SD; T de Student, p<0.05. **(E)** Se calculó el porcentaje de BMM en fase S del ciclo celular en varios tiempos tras la estimulación con GM-CSF recombinante en BMM procedentes de ratones p110^γ^{+/+} y p110^γ^{-/-} (se muestra la media de n = 2 experimentos, cada uno con un pool de 3 ratones/genotipo).

Para ahondar en el mecanismo que explicara la presencia de un menor número de macrófagos y de células T en las lesiones de aterosclerosis de los ratones deficientes en $p110\gamma$, se analizó la proliferación de dichos tipos celulares en las lesiones de los ratones $LDLR^{-/-}p110\gamma^{+/-}$ y $LDLR^{-/-}p110\gamma^{-/-}$ alimentados durante dos meses con dieta rica en colesterol (Figura R17). Se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia doble en secciones de seno aórtico procedentes de dichos ratones para determinar si la menor área $Mac-3^{+}$ y los menores números de células $CD3^{+}$ encontrados en las lesiones de los ratones $LDLR^{-/-}p110\gamma^{-/-}$ podían relacionarse con una menor proliferación de estos tipos celulares (estudiada mediante tinción con Ki67). También se tiñeron las células de músculo liso en las lesiones para determinar si la presencia de este tipo celular se hallaba afectado por la ausencia de $p110\gamma$ (Figura R18). Por otra parte, se cree que el M-CSF juega un papel fundamental en la inducción de la proliferación de los macrófagos de las lesiones de aterosclerosis (Antonov et al., 1997). También el GM-CSF está presente en las lesiones de aterosclerosis (Rajavashisth et al., 1990). En ensayos de ciclo celular realizados *in vitro* con macrófagos derivados de médula ósea procedentes de ratones $LDLR^{-/-}p110\gamma^{+/-}$ y $LDLR^{-/-}p110\gamma^{-/-}$, así como de ratones $p110\gamma^{+/-}$ y $p110\gamma^{-/-}$, se analizó la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular en varios tiempos de estimulación con M-CSF y con GM-CSF (Figura R17D, E).

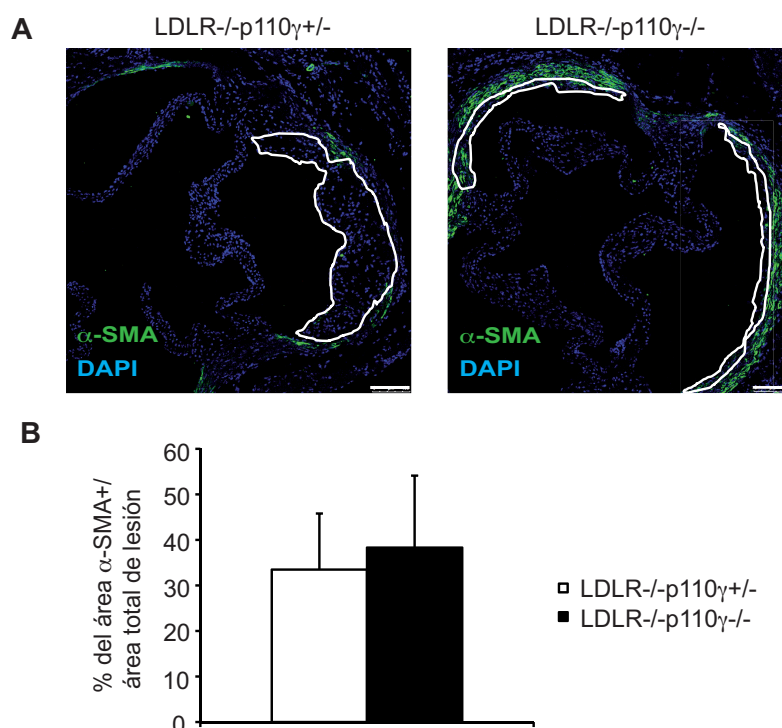


Figura R18. La expresión de α -actina de músculo liso en las lesiones no se ve afectada por la delección de $p110\gamma$. Se analizaron lesiones ateroscleróticas de ratones $LDLR^{-/-}p110\gamma^{+/-}$ y $LDLR^{-/-}p110\gamma^{-/-}$ tratados con dieta rica en grasa durante dos meses. **(A)** Se tiñó α -SMA mediante inmunofluorescencia en secciones de seno aórtico de dichos ratones ($n = 5$ ratones/genotipo). El área de lesión aparece delimitada. Barra = 100 μ m. **(B)** Se representa el porcentaje del área α -SMA⁺ relativa al total de la lesión. Media \pm SD.

Los estudios de inmunofluorescencia con Ki67 muestran una reducción significativa en el número de macrófagos proliferantes en la neoíntima en los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} comparados con los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} (Figura R17A, B). Por el contrario, la delección de p110^γ no parece afectar a la proliferación de células T (Figura R17C), ni a la abundancia relativa de células de músculo liso presentes en las lesiones (Figura R18A, B). La proporción de células en fase S del ciclo celular se reduce en los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} comparados con los LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} tras 26h de estimulación con M-CSF (Figura R17D), sugiriendo un papel para p110^γ en la progresión del ciclo celular de los macrófagos. Por el contrario, los análisis de ciclo celular para estudiar la proliferación de los BMM tras su estimulación con GM-CSF, no muestran diferencias en los porcentajes de células en fase S entre los BMM procedentes de ratones p110^γ^{+/-} y p110^γ^{-/-} (Figura R17E).

Estos resultados indican que p110^γ tiene un papel en la proliferación de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas, de modo que su ausencia provoca la menor proliferación de los mismos. Además, como se ha comprobado *in vitro*, esto ocurriría también en respuesta al M-CSF presente en las lesiones, pero no en respuesta al GM-CSF de las mismas. Las células T de las lesiones, sin embargo, no parecen presentar este defecto proliferativo en ausencia de p110^γ. Además, las células de músculo liso tampoco disminuyen en la neoíntima de los ratones deficientes en p110^γ, por lo que podría deducirse que se trata de un defecto específico de los macrófagos.

La apoptosis en las lesiones no se ve afectada por la deficiencia en p110^γ

La apoptosis, junto con la infiltración y la proliferación de las células inmunes, contribuye al control del número total de células inflamatorias que componen las lesiones ateroscleróticas. Por ello, y tras ver disminuida la proliferación de los macrófagos en las lesiones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} comparada con la de los macrófagos LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-}, se estudió la apoptosis en las mismas mediante la tinción de inmunofluorescencia para detectar TUNEL (Figura R19A) y caspasa-3 activa o fragmentada (Figura R19B) en secciones de aorta de ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} alimentados con dieta grasa durante dos meses. Mediante la tinción de TUNEL se marcan mediante inmunofluorescencia los extremos del DNA fragmentado propio de las células apoptóticas (Saraste, 1999). La caspasa-3 fragmentada, o forma activa de la caspasa-3, es el primer activador de la fragmentación del DNA en las células apoptóticas (Wolf et al., 1999).

Los resultados revelan que existe una tendencia hacia una menor apoptosis en los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} comparada con la de los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-}, pero las diferencias no son significativas entre los dos genotipos (Figura R19A, B). De este modo, p110^γ no parece intervenir tanto en el control del número de macrófagos en las lesiones mediante la apoptosis como lo hace mediante en el control de la infiltración y de la proliferación de los mismos.

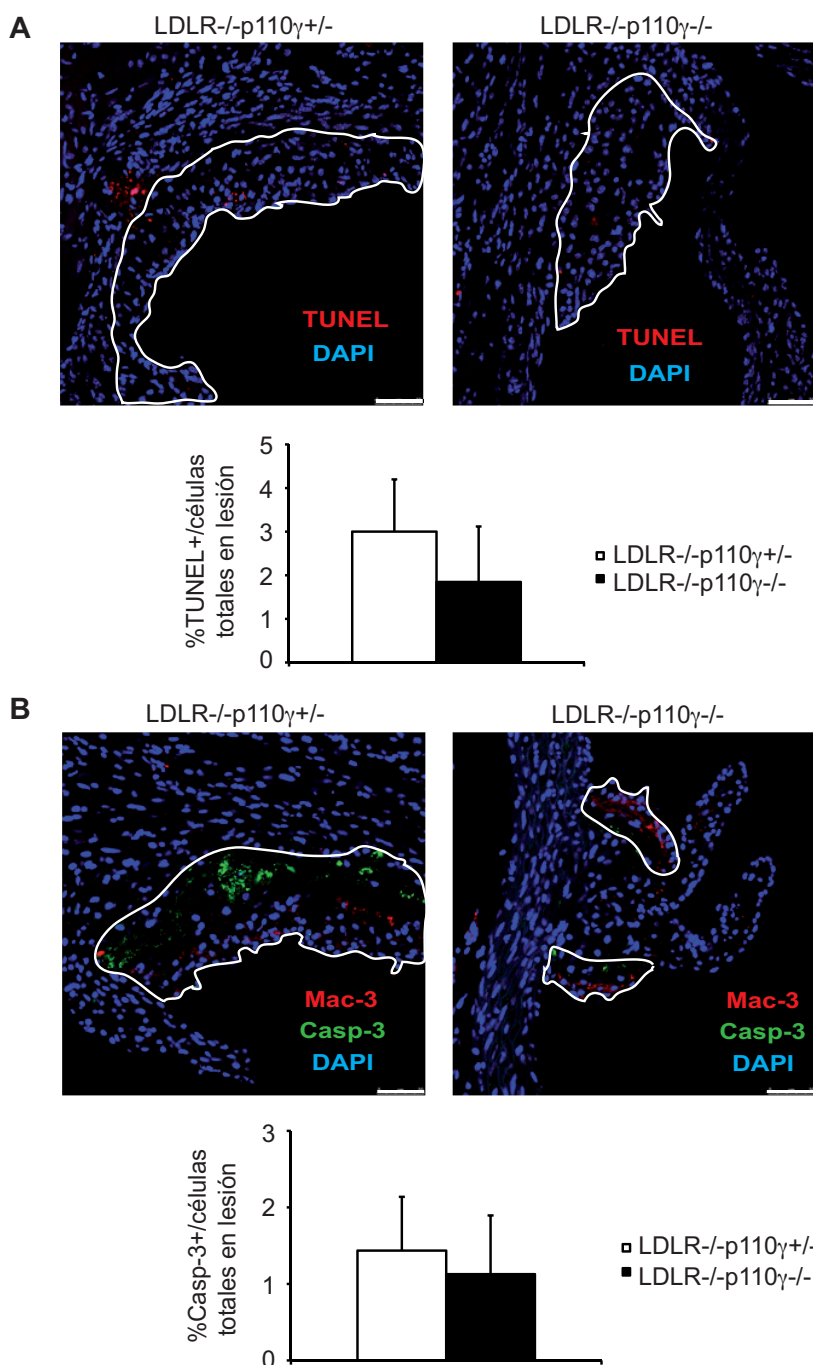


Figura R19. La apoptosis en las lesiones no se ve afectada por la delección de p110 γ . Se analizaron placas de ateroma procedentes de ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} tratados durante dos meses con dieta rica en grasa. **(A)** Se muestran imágenes representativas de la tinción TUNEL de inmunofluorescencia en secciones de seno aórtico procedentes de ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} ($n = 3$) y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} ($n = 5$) (arriba) Barra = 50 μ m; se muestra el porcentaje de las células TUNEL⁺ en relación con el número total de células en el área de lesión delimitada (abajo). Media \pm SD. **(B)** Imágenes representativas de tinciones de inmunofluorescencia para detectar caspasa-3 fragmentada en secciones de seno aórtico de ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} ($n = 4$) y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} ($n = 5$) (arriba) Barra = 50 μ m; se muestra el porcentaje de células caspasa-3⁺ en relación con el total de células en el área de lesión delimitada (abajo). Media \pm SD; T de Student.

Los niveles elevados de AMP cíclico se relacionan con la menor proliferación de los macrófagos en los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{-/-}

p110γ regula los niveles de cAMP en los cardiomiocitos (Voigt et al., 2006; Perino et al., 2011). Además, se sabe que en los macrófagos, los niveles elevados de cAMP intracelular inhiben la proliferación estimulada por M-CSF (Rock et al., 1992) mediante la parada del ciclo celular en la fase G1 (Kato et al., 1994; Xaus et al., 1999). Por ello, se comprobó si ocurría algo similar en los BMM procedentes de ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} midiendo el cAMP intracelular mediante *western blot* de lisados de BMM de estos ratones en varios tiempos de estimulación con M-CSF y mediante ELISA (Figura R20).

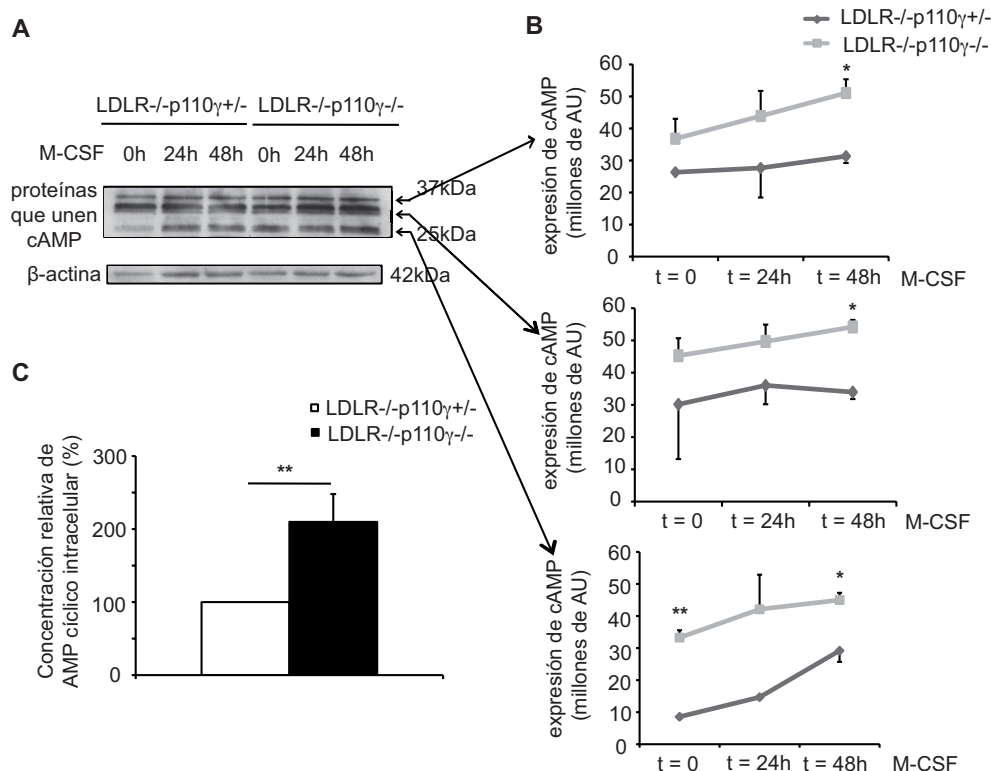


Figura R20. Los niveles de AMP cíclico intracelular son mayores en los macrófagos de los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} que en los de los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-}. (A) Se diferenciaron BMM, se activaron con M-CSF en distintos tiempos (0, 24 y 48 h) y se lisaron. Se realizó un *western blot* de dichos lisados de proteína total de BMM procedentes de ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} para detectar la expresión de proteínas que llevan unido cAMP a t = 0 y tras la estimulación con M-CSF. Se presenta el resultado de un experimento representativo de los realizados. (B) Respecto al *western blot* mostrado en (A), se cuantificaron las bandas correspondientes a las proteínas de 3 pesos moleculares diferentes que se repiten en todos los experimentos, mediante densitometrado con el software ImageJ. Los resultados de la cuantificación se representan como el nivel total de cAMP (medido en AU x 10⁶). Cada gráfica muestra la media de la cuantificación de 2 experimentos independientes. (C) Se realizó un ELISA para determinar los niveles intracelulares de cAMP en lisados procedentes de BMM de ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} sin estimular con M-CSF (t = 0). En la gráfica aparece el porcentaje de incremento de la concentración intracelular de cAMP en los BMM de los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} con respecto a los LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} (n = 3 experimentos). Media ± SD; T de Student, p<0.05 y p<0.01.

Los niveles intracelulares de cAMP detectados en los lisados de BMM de ratones LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} y LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} a tiempos 0, 24h y 48h de estimulación con M-CSF son mayores en los ratones LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} que en los LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} (Figura R20A, B). Estos datos indican que la parada del ciclo celular en G0/G1 encontrada para los BMM LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} (Figura R17D) parece estar en relación con los niveles de cAMP intracelulares (Figura R20A, B) tras la estimulación con M-CSF. Los resultados obtenidos mediante ELISA confirman los datos anteriores revelando una mayor concentración de cAMP intracelular en los BMM de los ratones LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} en comparación con los BMM de los ratones LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} (Figura R20C). De este modo, se estima que el mecanismo implicado en la menor proliferación de los macrófagos LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} versus (vs) los LDLR^{-/-}p110^{γ+/-}, podría implicar a p110^γ y al cAMP.

La deficiencia en p110^γ no afecta a la polarización de los macrófagos hacia los fenotipos M1 y M2

El cAMP está ligado a la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 (Ruffell et al., 2009). Además, se ha descrito la transición de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas de un fenotipo M2 hacia un fenotipo M1 con el avance de la enfermedad (Khallou-Laschet et al., 2010). Tras observar niveles elevados de cAMP en los BMM de los ratones LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} (Figura R20), se analizó la polarización de los macrófagos LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} y LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} hacia los fenotipos M1 y M2 en las lesiones ateroscleróticas (Figura R21) para determinar la implicación de p110^γ en este proceso. Se realizaron tinciones de inmunofluorescencia para detectar macrófagos de tipo M1 (iNOS⁺) y M2 (arginasa-1⁺) en secciones de seno aórtico procedentes de ratones LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} y LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} alimentados durante dos meses con dieta rica en grasa. Además, se analizó la expresión de marcadores de tipo M1 (iNOS, IL-12) y M2 (arginasa-1, IL-10, YM1) en BMM de ratones p110^{γ+/-} y p110^{γ-/-} estimulados *in vitro* hacia el fenotipo M1 (IFN^γ + LPS) o M2 (IL-4).

Los experimentos de inmunofluorescencia no muestran diferencias en el porcentaje de macrófagos de tipo M1 (iNOS⁺) y M2 (arginasa-1⁺) en secciones de cayado aórtico procedentes de ratones LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} y LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} (Figura R21A, B), a pesar de que existe una tendencia hacia un aumento en los macrófagos de tipo M2 en los ratones LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} comparados con los LDLR^{-/-}p110^{γ+/-}. De acuerdo con estos datos, los estudios de qRT-PCR en extractos de RNA total de BMM de ratones p110^{γ+/-} y p110^{γ-/-} estimulados *in vitro* hacia el fenotipo M1 o M2, no muestran diferencias en la expresión de los marcadores de tipo M1 (iNOS, IL-12) ni M2 (arginasa-1, IL-10, YM1) (Figura R21C, D). Estos resultados indican que p110^γ no parece tener un papel fundamental en la polarización de los macrófagos hacia los fenotipos M1 o M2.

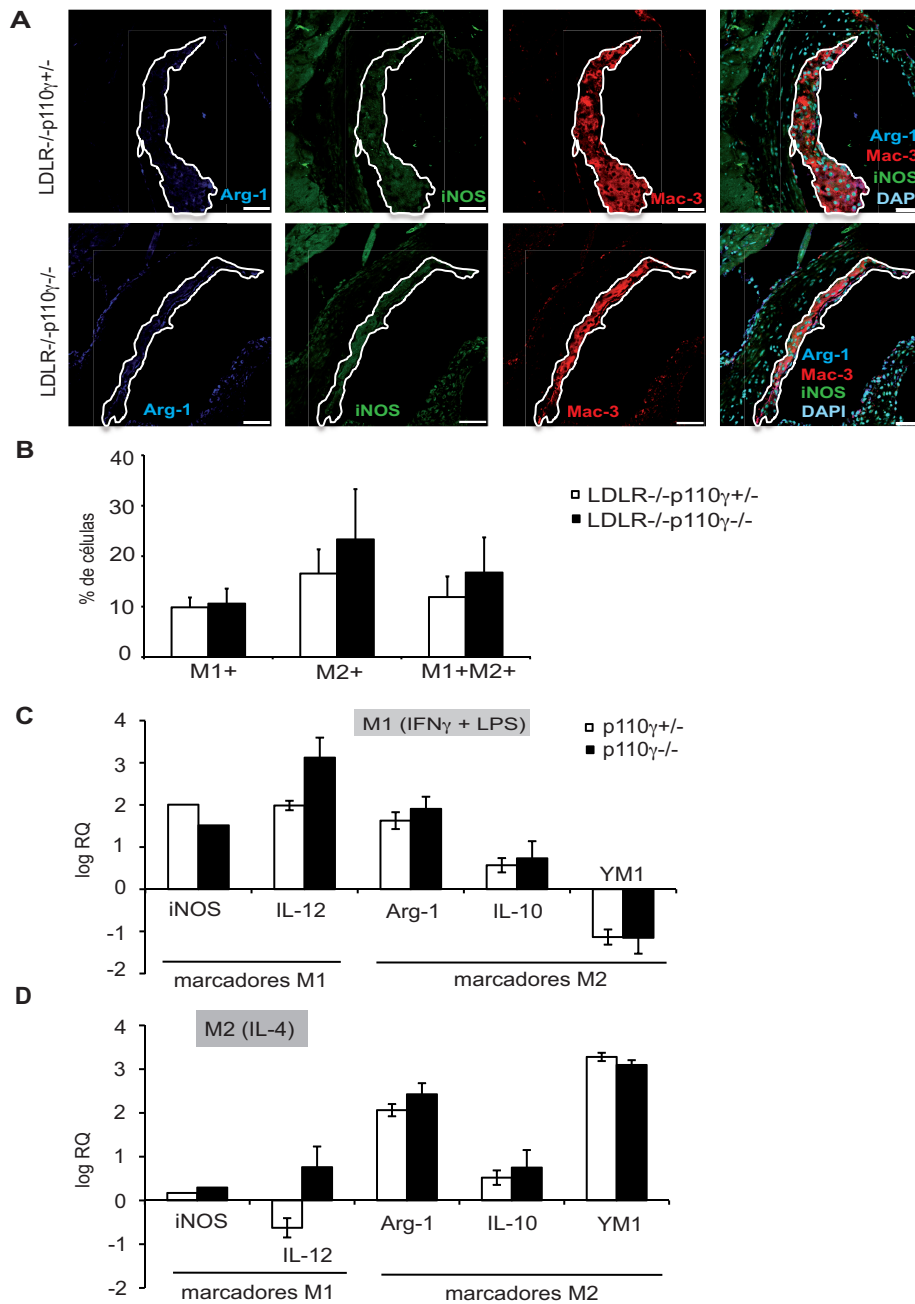
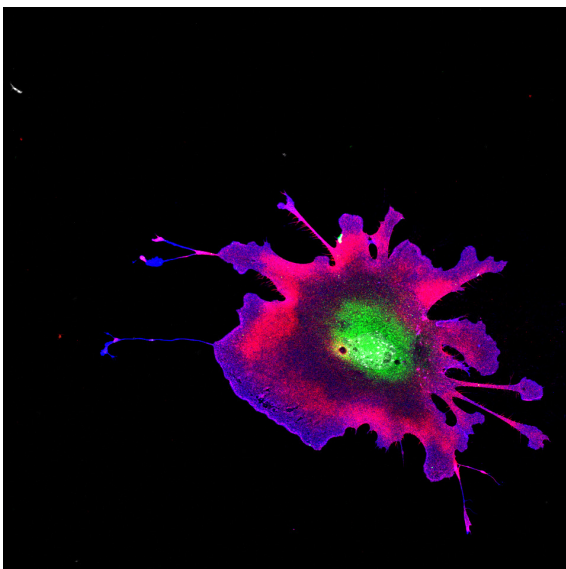


Figura R21. Las poblaciones de macrófagos M1 y M2 son similares en los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} y en los LDLR^{-/-}p110γ^{-/-}. (A) Imágenes representativas de tinciones de inmunofluorescencia para detectar macrófagos de tipo M1 (iNOS⁺) y M2 (arginasa¹⁺) en secciones de seno aórtico de ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} alimentados durante dos meses con una dieta rica en grasa ($n = 5$ ratones/genotipo). Barra = 50 μ m. (B) Cuantificación del porcentaje de macrófagos M1⁺ (iNOS⁺), M2⁺ (arginasa¹⁺) y M1⁺M2⁺ (iNOS⁺arginasa¹⁺) en relación con el número total de macrófagos en las placas de ateroma analizadas. Media \pm SD; test T de Student. La expresión de marcadores de tipo M1 (iNOS, IL-12) y M2 (arginasa1, YM1, IL-10) se analizó mediante qRT-PCR en extractos de RNA total de BMM estimulados con (C) IFN γ + LPS (M1) ($n = 3$ experimentos, cada uno con un pool de 2-3 ratones/genotipo) o (D) IL-4 (M2) ($n = 2$ experimentos, cada uno con un pool de 2-3 ratones/genotipo); se muestra la media \pm SD del log 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} para cada genotipo. RQ = 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}.

Les faits inattendus ébauchent généralement une voie de recherche intéressante. Il faut y être attentif car ils peuvent cacher une découverte inattendue.

(Los hechos inesperados trazan generalmente una vía de investigación interesante. Hay que estar atentos porque pueden ocultar un descubrimiento inesperado).

Pierre Joliot-Curie (Madrid, 15 de enero de 2013)



DISCUSIÓN

Implicación de p110 δ en la distribución de las células estromales de los órganos linfoides secundarios

La respuesta inmune está controlada por la función de los linfocitos y por las células estromales de los órganos linfoides secundarios (Mueller & Germain, 2009). La subunidad p110 δ de PI3K se expresa preferentemente en los leucocitos aunque también se expresa en otros tipos celulares (Eickholt et al., 2007; Sawyer et al., 2003; Geng et al., 2004; Puri et al., 2004). Los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ y los deficientes en p110 δ presentan defectos estructurales en los SLO (Okkenhaug et al., 2002; Clayton et al., 2002; Jou et al., 2002). Hemos analizado si esta isoforma catalítica de PI3K se expresa también en las células estromales de los SLO pudiendo mediar funciones celulares implicadas su correcta organización y afectando, de este modo, a la respuesta inmune.

Nuestros resultados confirman los defectos estructurales descritos en los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$, en concreto, la disminución del tamaño de los folículos linfoides de los SLO (Okkenhaug et al., 2002) así como la casi completa desaparición de las MZB del bazo (Durand et al., 2009). Además, la drástica disminución de las MZB de la zona marginal del bazo en los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ también se ha descrito en los ratones deficientes en p110 δ (Clayton et al., 2002; Jou et al., 2002). Sin embargo, no se había relacionado esta isoforma de PI3K con la desorganización de los MMM ni de los MZM que también describimos y pueden tener relevancia en la elaboración de la respuesta inmune ya que ambos tipos de macrófagos funcionan como APC para los linfocitos de la pulpa blanca del bazo (Mebius & Kraal, 2005). Además, se sabe que las MZB influyen en la correcta distribución de los MMM y de los MZM en la zona marginal (Nolte et al., 2004) y que los MZM controlan la retención de las MZB en esta misma zona del bazo (Karlsson et al., 2003). Por ello, los defectos que observamos en una de estas poblaciones de células de la zona marginal del bazo se verán exacerbados por los defectos presentes en las otras poblaciones.

La función de p110 δ se ha estudiado extensamente en varios tipos celulares inmunes (Okkenhaug & Vanhaesebroeck, 2003). Los ensayos de reconstitución son una herramienta para detectar funciones específicas de p110 δ en las células del sistema inmune, como se ha descrito para las células T de memoria (Liu & Uzonna, 2010), para lo cual se irradiaron letalmente ratones WT y se reconstituyeron con células T de memoria purificadas y marcadas con CFSE (células T de memoria central CD62L^{alto} y células T de memoria efectoras CD62L^{bajo}) procedentes de ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$ (Liu & Uzonna, 2010). Nosotros hemos utilizado ensayos de reconstitución con médula ósea total procedente de ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ o p110 $\delta^{D910A/D910A}$ para determinar si las células estromales tienen un papel en la reconstitución de los órganos linfoides secundarios en las distintas condiciones estudiadas (ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ reconstituidos con médula p110 $\delta^{WT/WT}$, ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ reconstituidos con médula p110 $\delta^{D910A/D910A}$, ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ reconstituidos con médula p110 $\delta^{WT/WT}$ y ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ reconstituidos con médula p110 $\delta^{D910A/D910A}$).

La reconstitución de ratones de cualquiera de los dos genotipos con médula procedente de ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ provoca la reducción del número total de las células del bazo si se compara con los ratones de cualquier genotipo reconstituidos con médula $p110\delta^{WT/WT}$, de modo similar a lo que ocurre en las reconstituciones de ratones WT con médula procedente de ratones dobles knockout para $p110\delta$ y $p110\gamma$ (Beer-Hammer et al., 2010). Una explicación posible de esta reducción sería que las células B procedentes de los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ muestran una menor migración hacia CXCL13, quimioquina quimioatrayente para las células B. Esto tiene como resultado la aparición de defectos en la migración y en la localización de las células B en los SLO, especialmente en el bazo y en las placas de Peyer (Reif et al., 2004), lo que coincide con nuestros resultados en bazo (Figura R6A, B). Además, encontramos que existe una menor expresión de CXCL13 en los bazos de los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ mientras que en los LN no hay diferencias entre los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$. Estos resultados podrían también clarificar por qué los números totales de células de los LN en los ratones reconstituidos con médula $p110\delta^{D910A/D910A}$ no muestran diferencias si se comparan con los LN de los ratones reconstituidos con médula $p110\delta^{WT/WT}$ (Figura R4A). Tras la reconstitución, las células T aparentemente migran de manera correcta al bazo y a los nódulos linfáticos, lo que coincide con estudios que muestran que las células T procedentes de los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ migran correctamente hacia las quimioquinas implicadas en su distribución en los SLO (CCL19 y CCL21) (Reif et al., 2004).

Los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ reconstituidos con médula $p110\delta^{D910A/D910A}$ muestran números normales de células T $CD4^+$ (Figuras R3B y R4B) que, sin embargo, se reducen en los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ reconstituidos con médula $p110\delta^{D910A/D910A}$, lo que sugiere que las células estromales de los SLO podrían tener un papel en la migración y en el correcto posicionamiento de las células T en los SLO. Cuando los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ se reconstituyen con médula $p110\delta^{WT/WT}$, los números de células T $CD4^+$ de los SLO no aumentan en respuesta a *C. albicans* inactivada por calor, sugiriendo que el estroma $p110\delta^{D910A/D910A}$ tiene un defecto que impide la expansión de las células T $CD4^+$ en respuesta a la estimulación antigénica. Así, inferimos que $p110\delta$ podría tener un papel en la función de las células estromales de los órganos linfoides secundarios.

Por otro lado, encontramos que las células T activadas ($CD44^{alto}$), y los subtipos celulares que darán lugar a las células T de memoria central ($CD44^{alto}CD62L^{alto}$) y efectora ($CD44^{alto}CD62L^{bajo}$) (Sallusto & Lanzavecchia, 2001), no aumentan tras la estimulación antigénica en los bazos de los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$, mientras que sí que lo hacen de forma moderada en los bazos procedentes de ratones $p110\delta^{WT/WT}$, lo que indica que $p110\delta$ contribuye a la elaboración de una respuesta inmune de memoria efectiva en bazo. En los LN, las células T activadas ($CD44^{alto}$) así como los dos fenotipos de células T de memoria descritos, aumentan tras la estimulación antigénica en los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y en los $p110\delta^{D910A/D910A}$ a pesar de que en estos últimos la respuesta es menor que en los $p110\delta^{WT/WT}$. Esto podría indicar que el existe una asimetría entre el bazo y los LN en la

generación de la respuesta inmune de memoria, que aparece más afectada en el bazo que en los LN de los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$. Por lo tanto, nuestros resultados coinciden con estudios previos que muestran la existencia de un defecto en la generación de células T de memoria en los ratones knock-in para $p110\delta$ (Liu & Uzonna, 2010).

Al estudiar la textura de las poblaciones de células estromales de los órganos linfoides secundarios de los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$, utilizamos un marcador general de estroma (ER-TR7), que se expresa en varios tipos celulares estromales (Mueller & Germain, 2009), y marcadores para subtipos de células estromales específicas, incluyendo α -5 integrina para los fibroblastos de la pulpa roja del bazo (Mueller & Germain, 2009), RANKL para las MRC de la zona marginal del bazo y presentes bajo el seno subcapsular de los LN (Mueller & Germain, 2009; Katakai, 2012), y gp38 para las FRC de la zona T del bazo y de los LN (Mueller & Germain, 2009; Farr et al., 1992). En el bazo, existen diferencias en la textura estromal, tanto para ER-TR7 como para los marcadores específicos estudiados, entre los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$, lo que indica una afectación del estroma del mismo debido a la ausencia de actividad catalítica $p110\delta$. En los LN nos centramos en las FRC, la población más afectada por la ausencia de actividad catalítica $p110\delta$ de entre las analizadas. También existen diferencias en la textura de las células estromales gp38⁺ en los LN, aunque menores que en el bazo, entre los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y $p110\delta^{D910A/D910A}$. Sin embargo, gp38 también se expresa en las células endoteliales linfáticas presentes en los vasos linfáticos aferentes de los LN (Fletcher et al., 2011). Por ello, al realizar la cuantificación en los LN tuvimos en cuenta este hecho y no incluimos las regiones con morfología similar a vasos linfáticos, para evitar errores en la obtención e interpretación de los resultados.

Aunque $p110\delta$ se expresa en los leucocitos y en otros tipos celulares, sin embargo, no hay estudios que describan su expresión en los subtipos de células estromales de los SLO. Por ello, decidimos extraer y cultivar las células estromales procedentes del bazo y de los LN de ratones $p110\delta^{WT/WT}$ y analizar en ellas la expresión de $p110\delta$ mediante inmunofluorescencia. Preferimos ese método a la qRT-PCR ya que los niveles de mRNA detectados mediante esta última no siempre se corresponden con los niveles de proteína detectados mediante tinción de inmunofluorescencia y por la dificultad que entraña el conseguir poblaciones estromales purificadas. Fletcher (Fletcher et al., 2011) diferencia subgrupos de células estromales en los SLO, incluyendo LEC (gp38⁺CD31⁺), que construyen los vasos linfáticos capsulares en los LN, FRC (gp38⁺CD31⁻), que forman la red de conductos para el transporte antigénico y sirven de soporte para la migración de las células inmunes, VEC o BEC (gp38⁺CD31⁺), que construyen los vasos sanguíneos corticales, los capilares y las HEV de los LN y los vasos sanguíneos del bazo, y las células dobles negativas (gp38⁻CD31⁻), cuya función exacta aún se desconoce (Fletcher et al., 2011). Por ello, realizamos una tinción de inmunofluorescencia para detectar los marcadores gp38, CD31, $p110\delta$ y F4/80 (este último para identificar a los macrófagos contaminantes, especialmente en los cultivos estromales de bazo), y encontramos que

p110 δ se expresa en las células estromales gp38⁺ como las FRC del bazo y de los LN, y las LEC de los LN. Existen FRC en ambos SLO estudiados, como se preveía (Fletcher et al., 2011; Bajenoff et al., 2008), pero sólo identificamos LEC en cultivos estromales de LN. A pesar de que se ha descrito la presencia de vasos linfáticos eferentes (que teóricamente serían gp38⁺CD31⁺) en el bazo de ratón (Pellas & Weiss, 1990), la presencia de LEC gp38⁺CD31⁺ en dichos órganos todavía no está clara (Mueller & Germain, 2009). Además, detectamos expresión de p110 δ en las células del endotelio vascular (gp38⁺CD31⁺), lo que coincide con trabajos previos en que describen la expresión de p110 δ en líneas celulares endoteliales (Geng et al., 2004; Puri et al., 2004).

Las FRC son necesarias para la generación de la respuesta inmune y para la presentación antigénica (Link et al., 2007; Mueller & Ahmed, 2008) ya que forman una red en el bazo y en los nódulos linfáticos que hace de soporte para la migración de las células T y para su correcta localización en los SLO (Bajenoff et al., 2008; Bajenoff et al., 2006); también secretan CCL19 y CCL21 (Luther et al., 2000). Existe una menor expresión de CCL19 y de CCL21 en los extractos de RNA total del bazo de los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ comparados con los p110 $\delta^{WT/WT}$. La falta de actividad catalítica p110 δ en las FRC podría dañar la generación de la respuesta inmune y/o la correcta distribución de las células T en condiciones de homeostasis y tras estimulación antigénica.

Los ratones LT $\alpha^{-/-}$, LT $\beta^{-/-}$ y LT $\beta R^{-/-}$ presentan defectos similares a los que observamos en los bazos de los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ (estructura de la pulpa blanca alterada, pérdida de la zona marginal y pérdida de la segregación de las células B y T) (Banks et al., 1995; Koni et al., 1997; Futterer et al., 1998). Sin embargo, no observamos diferencias en la expresión de LT α y LT β en el bazo ni en los LN entre los ratones p110 $\delta^{WT/WT}$ y p110 $\delta^{D910A/D910A}$. La expresión de LT βR y de CCR7 aparece aumentada en los bazos de los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ comparados con los p110 $\delta^{WT/WT}$. Este hecho podría ser el resultado de un mecanismo compensatorio mediante el cual estos receptores serían sobreexpresados por otras células para compensar la falta de FRC, que expresan LT βR (Mueller & Germain, 2009), y la reducida expresión de los ligandos de CCR7 (CCL19 y CCL21) en los bazos de los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$.

La actividad PI3K y, específicamente, de p110 γ y p110 δ no es necesaria para la estimulación de las células T CD4⁺ por CCL21 (Gollmer et al., 2009), y el movimiento intrínseco de las células T en los LN, tras la estimulación del CCR7 con CCL19 o CCL21, también es independiente de la actividad PI3K (Asperti-Boursin et al., 2007). Como las células T no muestran defectos en migración hacia gradientes de CCL19 y de CCL21 (Reif et al., 2004), consideramos que las anomalías estructurales y funcionales encontradas en los SLO de los ratones p110 $\delta^{D910A/D910A}$ (especialmente en bazo), podrían ser el resultado de la falta de células estromales suficientes y/o su actividad. p110 δ podría afectar a la secreción de CCL19 y de CCL21 por parte de las células estromales, quimioquinas implicadas en la migración y en la correcta localización de las células T

en los SLO. Los vasos linfáticos aferentes a los LN, a diferencia de los que ocurre en el bazo, poseen células como las LEC que secretan ciertos niveles de CCL21 (Gunn et al., 1998b; Kriehuber et al., 2001); esto podría explicar en parte la correcta expresión de CCL21 en los LN de los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$. CCL21 estimula la expansión de las células T *naïve* y la polarización hacia fenotipo Th1 de las células T CD4⁺ (Flanagan et al., 2004). Si $p110\delta$ puede controlar la secreción de CCL21 por las células estromales, entonces podría influenciar la respuesta inmune mediada por células T CD4⁺ de tipo Th1. La quimioquina CXCL13 se expresa en niveles menores en los bazos de los ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$ comparados con los $p110\delta^{WT/WT}$. Esto podría deberse a que la actividad catalítica de $p110\delta$ estuviera implicada en la secreción de esta quimioquina por las MRC de la zona marginal, constituyendo una posible causa de que los ratones $p110\delta^{WT/WT}$ reconstituidos con médula $p110\delta^{D910A/D910A}$ presenten un ligero aumento en las MZB tras estimulación antigénica que no se detecta cuando los receptores de la médula $p110\delta^{D910A/D910A}$ son ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$.

Además, existen estudios que indican la existencia de defectos en la secreción de citoquinas por parte de varios tipos celulares procedentes de ratones $p110\delta^{D910A/D910A}$, como es el caso de los macrófagos $p110\delta^{D910A/D910A}$ y su menor secreción de TNF α (Low et al., 2010), los mastocitos $p110\delta^{D910A/D910A}$, que secretan menos IL-6 y TNF α que los $p110\delta^{WT/WT}$ (Ali et al., 2004) o las células B $p110\delta^{D910A/D910A}$, que también secretan menos IL-6 e IL-10 que las $p110\delta^{WT/WT}$ (Dil & Marshall, 2009). Este papel de $p110\delta$ en el control de la secreción celular está relacionado con la implicación de $p110\delta$ en el tráfico vesicular, descrita en macrófagos (Low et al., 2010), y podría ser una de las funciones en que esta isoforma de PI3K ejerciera su acción en las células estromales.

Numerosos estudios apuntan hacia la función de las FRC en la presentación antigénica y en el establecimiento de la tolerancia periférica (Mueller & Ahmed, 2008; Fletcher et al., 2010; Lukacs-Kornek & Turley, 2011). Nuestros resultados muestran que $p110\delta$ se expresa en las células estromales gp38⁺ de los órganos linfoides secundarios y subraya la importancia de su expresión en dichas células para el mantenimiento de la estructura de los SLO, contribuyendo a la preservación de la inmunocompetencia.

Implicación de PI3K p110 γ en la proliferación de los macrófagos en las lesiones ateroscleróticas

El número de macrófagos en las lesiones ateroscleróticas está controlado por la migración de los monocitos y por su infiltración en las lesiones, por la proliferación local de los macrófagos y por la apoptosis. PI3K p110 γ se ha implicado en la aterosclerosis, ya que su eliminación genética en los ratones ApoE^{-/-} provoca una reducción del tamaño de las placas de ateroma y la activación defectuosa de la ruta PI3K/Akt en los macrófagos de la neoíntima (Chang et al., 2007). La inhibición farmacológica de p110 γ reduce la aterosclerosis en los ratones ApoE^{-/-} y LDLR^{-/-}, y la reconstitución de los ratones LDLR^{-/-} con médula ósea p110 γ ^{-/-} provoca una disminución en la infiltración de las células T y de los monocitos en las placas ateroscleróticas (Fougerat et al., 2008). Sin embargo, aún es incierto si la delección de p110 γ también contribuye a la apoptosis y a la proliferación local de los macrófagos, y se desconoce el papel de p110 γ en la diferenciación de dichos macrófagos hacia los fenotipos M1 y M2. En este estudio, tratamos dichas cuestiones analizando el desarrollo de la aterosclerosis en los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-}.

De acuerdo con estudios previos (Chang et al., 2007; Fougerat et al., 2008), encontramos lesiones más pequeñas en el cayado aórtico de los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} comparadas con los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-}. La reactividad de los macrófagos deficientes en p110 γ se reduce en respuesta a agonistas aterogénicos (Chang et al., 2007). Por ello, evaluamos la captación de LDL modificado (LDL actilado) por los macrófagos como una posible causa de la reducción del tamaño de las lesiones en los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-}. Los macrófagos peritoneales procedentes de los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} no muestran diferencias en cuanto a la captación de LDLac. Un estudio reciente describe que los macrófagos procedentes de los ratones p110 γ ^{-/-} captan menos LDL nativo que los ratones control (Anzinger et al., 2012). La diferencia con nuestros resultados podría residir en que la captura de LDL nativo se produce vía macropinocitosis, mientras que el LDLmod (como el LDLac), se captura a través de receptores scavenger (Anzinger et al., 2012; Yao et al., 2009), con lo que p110 γ tendría un papel en la captura de LDL vía macropinocitosis pero no en la captura de LDLmod a través de los citados receptores.

La infiltración de las células inmunes constituye un paso importante en la formación y progresión de la placa de ateroma (Weber & Noels, 2011). Nuestros experimentos muestran una menor región teñida positivamente para Mac-3 y menor número de células T CD3⁺ en las lesiones de los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} comparados con los LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-}. Estos datos coinciden con los observados en el modelo murino ApoE^{-/-}p110 γ ^{-/-} (Chang et al., 2007) y en los ratones LDLR^{-/-} irradiados y reconstituidos con médula ósea de ratones p110 γ ^{-/-} (Fougerat et al., 2008). Las poblaciones circulantes de células T y monocitos inflamatorios Ly6C^{alto} no presentan diferencias en sus porcentajes entre los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-}, ni antes de administrarles la dieta rica en grasa ni tras dos meses de tratamiento con la misma. Por otro lado, los granulocitos (entre los que

se encuentran los neutrófilos), presentan un porcentaje mayor en sangre periférica en los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} que en los LDLR^{-/-}p110γ^{+/-}, antes y después del tratamiento con dieta rica en grasa. Estos datos coinciden con el fenotipo descrito para los ratones p110γ^{-/-} (Hirsch et al., 2000).

El número de células T reguladoras en las lesiones de aterosclerosis es muy bajo, como se ha reportado para los ratones LDLR^{-/-} (Gotsman et al., 2006) y para humanos (de Boer et al., 2007). Se observan muy pocas células Foxp3⁺ en las lesiones tempranas de los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110γ^{-/-}, lo que no nos permiten extraer diferencias entre los dos genotipos. Se sabe que el LDLox produce una disminución en la expresión de Foxp3 en las células efectoras de ratón *in vivo* (Mor et al., 2007). Por ello, la acumulación de LDLox en las lesiones podría inhibir la función de las células T reguladoras, contribuyendo así a la cronicidad de la enfermedad (Mor et al., 2007). Nuestros datos indican que p110γ no parece afectar a la infiltración de células T reguladoras en las placas de ateroma.

El bloqueo de CXCR3 reduce la formación de las placas de ateroma (van Wanrooij et al., 2008). Aunque la quimiotaxis de las células T CXCR3⁺ no depende de PI3K (Smit et al., 2003), se ha relacionado a p110γ con la expresión de CXCR3 en las células T activadas (Barbi et al., 2008). Sin embargo, no detectamos diferencias en la expresión de CXCR3 en extractos de RNA total de cayado aórtico y aorta torácica descendiente entre los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} y los LDLR^{-/-}p110γ^{-/-}. Esto podría explicarse ya que los extractos de cayado aórtico incluyen numerosos tipos celulares, no sólo las células que expresan CXCR3, con lo que los resultados quedarían enmascarados por el resto de tipos celulares presentes. Además, cuando estudiamos la expresión de CXCR3 en las células T CD4⁺ y CD8⁺ de los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} y los LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} en condiciones basales, apenas observamos CXCR3, lo que coincide con lo descrito por Barbi (Barbi et al., 2008). Tampoco encontramos diferencias en la expresión de CXCR3 en las células T CD4⁺ y CD8⁺ entre los ratones p110γ^{+/-} y los p110γ^{-/-}. Por otro lado, CCR2, CCR5 y CX₃CR1 están presentes en las lesiones ateroscleróticas en diferentes tipos celulares de las mismas (Zernecke et al., 2008) y la acumulación de monocitos de fenotipo inflamatorio (Ly6C^{alto}) depende de los ejes CCR2-CCL2, CX₃CR1-CX₃CL1 y CCR5-CCL5 (Tacke et al., 2007). Además, se sabe que su delección, por separado o bien conjunta, en modelos murinos de aterosclerosis (ApoE^{-/-} o LDLR^{-/-}) tiene como resultado una disminución drástica en el tamaño de las lesiones que desarrollan estos animales (Lesnik et al., 2003; Combadiere et al., 2003; Combadiere et al., 2008). De este modo, aunque las diferencias no son significativas, observamos una tendencia hacia una menor expresión de CCR2, CCR5 y CX₃CR1 en cayado aórtico y aorta torácica descendente procedente de ratones LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} comparada con la que encontramos en ratones LDLR^{-/-}p110γ^{+/-}, que coincide con el menor tamaño de las lesiones en los ratones LDLR^{-/-}p110γ^{-/-}, y que podría deberse a un menor reclutamiento de monocitos Ly6C^{alto}.

El número de macrófagos en las lesiones está controlado por la infiltración de los monocitos circulantes así como por la proliferación local de los macrófagos y por la apoptosis (Antonov et al., 1997; Sakai et al., 2000). Nuestros estudios de secciones aórticas muestran un porcentaje menor de macrófagos proliferantes en los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} comparados con los LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-}. Sin embargo, no hay diferencias en la proliferación de las células T entre los dos genotipos. Se han completado los análisis *in vivo* de la proliferación de macrófagos con experimentos *in vitro* utilizando BMM. Mientras que la proliferación inducida con GM-CSF es similar entre ratones p110^γ^{+/-} y p110^γ^{-/-}, existe una menor proliferación y un retraso en la entrada en fase de síntesis del ciclo celular en BMM estimulados con M-CSF procedentes de ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} comparados con los controles (LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-}), lo que refleja un papel específico de p110^γ en estos procesos y tras la estimulación con M-CSF. Además, teñimos α -actina de músculo liso (α -SMA) para detectar las células de músculo liso en secciones de seno aórtico de ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} y no encontramos diferencias entre los dos genotipos en el porcentaje de tinción α -SMA⁺ relativo a la lesión total. De este modo, como las células de músculo liso no se ven reducidas en la neoíntima de los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-}, dichas células no deberían presentar los defectos en proliferación encontrados para los macrófagos LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-}. Esto sugiere que el defecto proliferativo de los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} es específico de tipo celular, concretamente, de los macrófagos.

p110^γ tiene un papel en la proliferación de las células T (Sasaki et al., 2000; Alcazar et al., 2007), de las células B (Beer-Hammer et al., 2010), de las células cancerosas de meduloblastoma (Guerreiro et al., 2011) y de carcinoma hepatocelular (Dituri et al., 2011), aunque los mecanismos subyacentes aún se desconocen. Sin embargo, no detectamos diferencias en la proliferación de las células T en las lesiones de los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-}. Este hecho podría explicarse porque las células T son escasas en las lesiones ateroscleróticas (Swirski & Nahrendorf, 2013) con lo que la detección de diferencias entre los dos genotipos se vería dificultada. En los macrófagos, la proliferación mediada por el M-CSF se inhibe cuando los niveles intracelulares de AMP cíclico aumentan (Rock et al., 1992), lo que provoca la parada del ciclo celular en G1 (Kato et al., 1994; Xaus et al., 1999). La subunidad reguladora p84/p87^{PIKAP} de la clase I_B PI3K se expresa con niveles elevados en los macrófagos murinos. El complejo macromolecular p84/p110^γ/PDE3B regula los niveles de cAMP intracelulares (Voigt et al., 2006; Perino et al., 2011). p110^γ podría modular los niveles de cAMP en los macrófagos mediante la formación de este complejo. Así, proponemos que M-CSF induce la proliferación de los macrófagos mediante un mecanismo que implica la formación del complejo p84/p110^γ/PDE3B, provocando la degradación de cAMP (Figura D1A). En los macrófagos procedentes de los ratones LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-}, sin embargo, M-CSF no provoca la reducción de los niveles de cAMP, ya que la formación ineficaz del complejo p84/p110^γ/PDE3B por la ausencia de p110^γ causa un aumento en los niveles intracelulares del mismo (Figura D1B). Los niveles más elevados de cAMP que encontramos en los BMM de los ratones

LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} comparados con los LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} estarían relacionados con las tasas de proliferación, apoyando esta hipótesis.

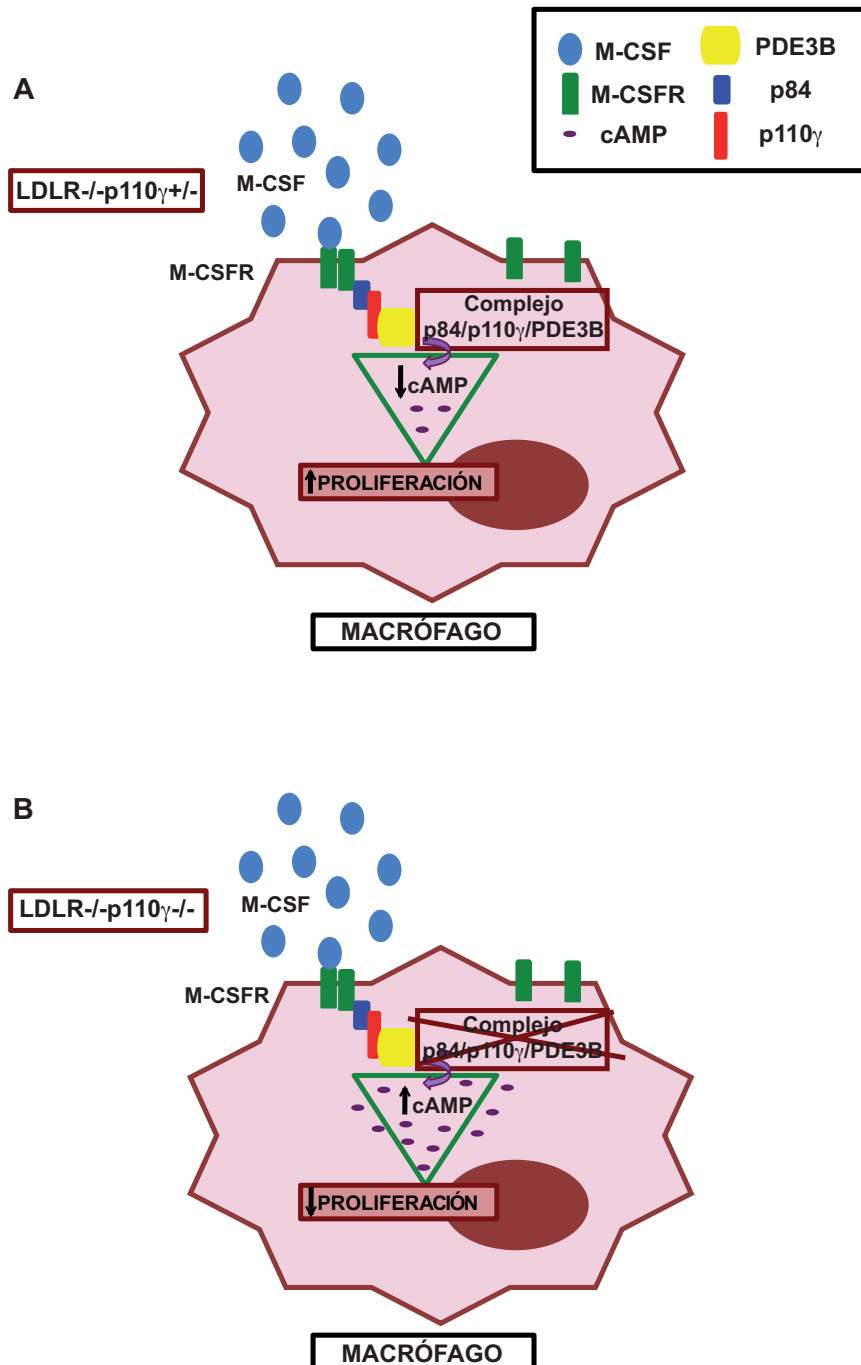


Figura D1. Esquema del mecanismo propuesto para la proliferación de los macrófagos en los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} y LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-}. (A) Mecanismo propuesto para los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-}. M-CSF induce la proliferación de los macrófagos mediante un mecanismo que implica la formación del complejo p84/p110 γ /PDE3B, provocando la degradación del cAMP. (B) Mecanismo propuesto para los ratones LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-}. En estos ratones, el M-CSF no provoca la reducción de los niveles de cAMP, ya que la formación ineficaz del complejo p84/p110 γ /PDE3B causa un aumento en dichos niveles, lo que desemboca en una menor proliferación.

La apoptosis se ha analizado mediante las tinciones de inmunofluorescencia de TUNEL y de caspasa-3 activa o fragmentada. La apoptosis no se ve afectada en las lesiones de los ratones LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} comparadas con las de los ratones LDLR^{-/-}p110^{γ-/-}, aunque se observa una tendencia hacia una menor apoptosis en las lesiones LDLR^{-/-}p110^{γ-/-}. Esta tendencia reflejaría un retraso en la progresión de las lesiones en los ratones LDLR^{-/-}p110^{γ-/-}, que presentan placas menos avanzadas que los ratones LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} después de estar tratados durante el mismo tiempo con dieta grasa. Las tasas de apoptosis tras dos meses de administración de dieta grasa son bajas en los ratones de ambos genotipos, posiblemente debido a que las lesiones desarrolladas en este punto son todavía algo tempranas y las células apoptóticas serían correctamente eferocitadas, proceso que empeora con la severidad de las lesiones y desemboca en la acumulación de células apoptóticas para formar el núcleo necrótico (Tabas, 2005).

Los macrófagos sufren activación clásica en respuesta a LPS e IFN-γ, como parte de la respuesta Th1 (M1), o activación alternativa en respuesta a IL-4 como parte de la respuesta de tipo Th2 (M2) (Gordon & Taylor, 2005). Las lesiones avanzadas de los ratones ApoE^{-/-} muestran una prevalencia de los macrófagos de tipo M1 sobre los de tipo M2, sugiriendo que el fenotipo M2 podría ser ateroprotectivo (Khallou-Laschet et al., 2010). En los macrófagos primarios activados, la expresión de genes relacionados con el fenotipo M2 (*Arg-1*, *Il-10*, *Il13ra*, *Msr1*) depende de la expresión de Cebpb inducida por CREB (Ruffell et al., 2009). De este modo, los niveles elevados de cAMP podrían estar ligados a la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2. Nuestros datos procedentes de ratones LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} y LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} no muestran sin embargo diferencias significativas en el número relativo de macrófagos de tipo M1 y M2 en las lesiones ateroscleróticas, aunque habría cierta tendencia hacia un mayor porcentaje de macrófagos de tipo M2 en los ratones LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} comparados con los LDLR^{-/-}p110^{γ+/-}. De manera similar, la polarización *in vitro* de los macrófagos no aparece afectada si comparamos los BMM p110^{γ+/-} con los p110^{γ-/-}, ya que muestran niveles similares de expresión de los marcadores de tipo M1 (iNOS) y M2 (arginasa-1, IL-10, YM1).

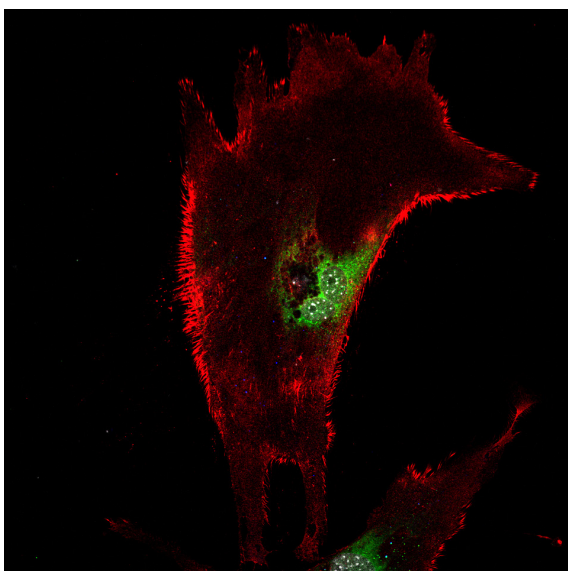
Nuestros resultados sugieren que, además de afectar a la infiltración de los macrófagos, la delección de p110^γ altera específicamente la proliferación de macrófagos *in situ* en las lesiones ateroscleróticas. En los macrófagos estimulados con M-CSF, p110^γ podría actuar por debajo del receptor M-CSFR mediante un mecanismo que redujera los niveles de cAMP, promoviendo así la proliferación de los macrófagos. Por el contrario, p110^γ no parece tener un papel fundamental en la polarización de los macrófagos hacia los fenotipos M1 y M2 o en la apoptosis. Nuestros resultados confirman un mecanismo mediante el cual las lesiones ateroscleróticas podrían reducirse, y subraya p110^γ como una potencial diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

En conjunto, este trabajo contribuye a incrementar el conocimiento de la contribución de dos subunidades catalíticas de PI3K (p110^δ y p110^γ) en la elaboración

de la respuesta inmune así como en el desarrollo de patologías inflamatorias como la aterosclerosis. Por un lado, describimos la expresión de p110 δ en las células estromales de los órganos linfoides secundarios así como la implicación de su actividad catalítica en la correcta distribución de dichas células. Por otro lado, definimos un mecanismo que controla la proliferación de los macrófagos presentes en las placas de ateroma, dependiente de p110 γ en relación con el AMP cíclico intracelular de dichos macrófagos.

*Lo que los hombres realmente quieren no es el conocimiento sino la
certidumbre.*

Russell Bertrand (1872-1970)



CONCLUSIONES

p110 δ se expresa en las células estromales de los órganos linfoides secundarios y está implicada en su distribución en los mismos:

- 1- p110 δ determina la presencia y la correcta distribución en el bazo de las poblaciones linfoides de la zona marginal.
- 2- p110 δ está implicada en la organización de la microarquitectura de las células estromales de los órganos linfoides secundarios.
- 3- p110 δ se expresa en las células estromales gp38⁺ de los órganos linfoides secundarios.

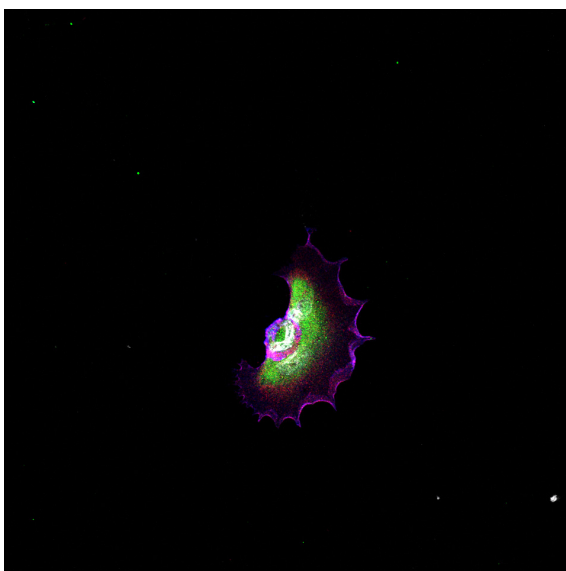
p110 γ participa en el desarrollo de la patología aterosclerótica, concretamente en la proliferación de los macrófagos presentes en las lesiones:

- 4- p110 γ tiene un papel en la infiltración de las células en las lesiones ateroscleróticas que no parece deberse a la afectación de la expresión de las quimioquinas y de los receptores de quimioquinas analizados (CXCR3, CXCL9, CXCL10, CX₃CR1, CCR5 y CCR2) en dichas lesiones.
- 5- Los macrófagos presentes en las placas de ateroma de los ratones LDLR^{-/-} p110 γ ^{-/-} proliferan menos que los de los ratones LDLR^{-/-} p110 γ ^{+/-}.
- 6- Los macrófagos procedentes de los ratones LDLR^{-/-} p110 γ ^{-/-} presentan mayores niveles de AMP cíclico intracelular en relación con la menor proliferación observada, lo que supone un papel de p110 γ en el control de los niveles de AMP cíclico en los macrófagos.
- 7- p110 γ no contribuye a la proliferación de las células T presentes en las placas de ateroma.
- 8- p110 γ no parece estar implicada en la apoptosis de las células presentes en las placas de ateroma.
- 9- La falta de p110 γ no afecta a la polarización de los macrófagos hacia los fenotipos M1 o M2.

En conjunto, este trabajo clarifica el papel de dos subunidades catalíticas de PI3K (p110 δ y p110 γ), en la función inmune. Nuestros datos demuestran que la actividad catalítica de p110 δ determina, de alguna manera, la distribución de las células estromales de los órganos linfoides secundarios y que p110 δ se expresa en dichas células, también implicadas en la elaboración de la respuesta inmune. Además, hemos estudiado la importancia de p110 γ en el desarrollo de la aterosclerosis, en concreto hemos descrito la implicación de dicha isoforma de PI3K en la proliferación de los macrófagos en las lesiones a través de un mecanismo que parece depender de los niveles intracelulares del AMP cíclico.

Las cosas no valen por el tiempo que duran sino por las huellas que dejan.

Proverbio árabe



BIBLIOGRAFÍA

Alcazar, I., M. Marques, A. Kumar, E. Hirsch, M. Wymann, A.C. Carrera, and D.F. Barber (2007) Phosphoinositide 3-kinase gamma participates in T cell receptor-induced T cell activation. *J Exp Med.* 204:2977-2987.

Ali, K., A. Bilancio, M. Thomas, W. Pearce, A.M. Gilfillan, C. Tkaczyk, N. Kuehn, A. Gray, J. Giddings, E. Peskett, R. Fox, I. Bruce, C. Walker, C. Sawyer, K. Okkenhaug, P. Finan, and B. Vanhaesebroeck (2004) Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. *Nature.* 431:1007-1011.

Andersson, E.C., J.P. Christensen, O. Marker, and A.R. Thomsen (1994) Changes in cell adhesion molecule expression on T cells associated with systemic virus infection. *J Immunol.* 152:1237-1245.

Andersson, J., P. Libby, and G.K. Hansson (2010) Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol.* 134:33-46.

Antonov, A.S., D.H. Munn, F.D. Kolodgie, R. Virmani, and R.G. Gerrity (1997) Aortic endothelial cells regulate proliferation of human monocytes in vitro via a mechanism synergistic with macrophage colony-stimulating factor. Convergence at the cyclin E/ p27(Kip1) regulatory checkpoint. *J Clin Invest.* 99:2867-2876.

Anzinger, J.J., J. Chang, Q. Xu, M.K. Barthwal, T. Bohnacker, M.P. Wymann, and H.S. Kruth (2012) Murine bone marrow-derived macrophages differentiated with GM-CSF become foam cells by PI3Kgamma-dependent fluid-phase pinocytosis of native LDL. *J Lipid Res.* 53:34-42.

Asperti-Boursin, F., E. Real, G. Bismuth, A. Trautmann, and E. Donnadieu (2007) CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. *J Exp Med.* 204:1167-1179.

Ato, M., H. Nakano, T. Kakiuchi, and P.M. Kaye (2004) Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19. *J Immunol.* 173:4815-4820.

Bajenoff, M., J.G. Egen, L.Y. Koo, J.P. Laugier, F. Brau, N. Glaichenhaus, and R.N. Germain (2006) Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity.* 25:989-1001.

Bajenoff, M., N. Glaichenhaus, and R.N. Germain (2008) Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. *J Immunol.* 181:3947-3954.

Banks, T.A., B.T. Rouse, M.K. Kerley, P.J. Blair, V.L. Godfrey, N.A. Kuklin, D.M. Bouley, J. Thomas, S. Kanangat, and M.L. Mucenski (1995) Lymphotoxin-alpha-deficient mice.

Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol.* 155:1685-1693.

Barber, D.F., A. Bartolome, C. Hernandez, J.M. Flores, C. Fernandez-Arias, L. Rodriguez-Borlado, E. Hirsch, M. Wymann, D. Balomenos, and A.C. Carrera (2006) Class IB-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) deficiency ameliorates IA-PI3K-induced systemic lupus but not T cell invasion. *J Immunol.* 176:589-593.

Barber, D.F., A. Bartolome, C. Hernandez, J.M. Flores, C. Redondo, C. Fernandez-Arias, M. Camps, T. Ruckle, M.K. Schwarz, S. Rodriguez, A.C. Martinez, D. Balomenos, C. Rommel, and A.C. Carrera (2005) PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med.* 11:933-935.

Barbi, J., H.E. Cummings, B. Lu, S. Oghumu, T. Ruckle, C. Rommel, W. Lafuse, C.C. Whitacre, and A.R. Satoskar (2008) PI3Kgamma (PI3Kgamma) is essential for efficient induction of CXCR3 on activated T cells. *Blood.* 112:3048-3051.

Barlic, J., Y. Zhang, and P.M. Murphy (2007) Atherogenic lipids induce adhesion of human coronary artery smooth muscle cells to macrophages by up-regulating chemokine CX3CL1 on smooth muscle cells in a TNFalpha-NFkappaB-dependent manner. *J Biol Chem.* 282:19167-19176.

Beer-Hammer, S., E. Zebedin, M. von Holleben, J. Alferink, B. Reis, P. Dresing, D. Degrandi, S. Scheu, E. Hirsch, V. Sexl, K. Pfeffer, B. Nurnberg, and R.P. Piekorz (2010) The catalytic PI3K isoforms p110gamma and p110delta contribute to B cell development and maintenance, transformation, and proliferation. *J Leukoc Biol.* 87:1083-1095.

Benezech, C., A. White, E. Mader, K. Serre, S. Parnell, K. Pfeffer, C.F. Ware, G. Anderson, and J.H. Caamano (2010) Ontogeny of stromal organizer cells during lymph node development. *J Immunol.* 184:4521-4530.

Berod, L., C. Heinemann, S. Heink, A. Escher, C. Stadelmann, S. Drube, R. Wetzker, J. Norgauer, and T. Kamradt (2011) PI3Kgamma deficiency delays the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and ameliorates its clinical outcome. *Eur J Immunol.* 41:833-844.

Biwa, T., M. Sakai, T. Matsumura, S. Kobori, K. Kaneko, A. Miyazaki, H. Hakamata, S. Horiuchi, and M. Shichiri (2000)a Sites of action of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase are distinct in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Biol Chem.* 275:5810-5816.

Biwa, T., M. Sakai, M. Shichiri, and S. Horiuchi (2000)b Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plays an essential role in oxidized low density lipoprotein-induced

macrophage proliferation. *J Atheroscler Thromb.* 7:14-20.

Camps, M., T. Ruckle, H. Ji, V. Ardisson, F. Rintelen, J. Shaw, C. Ferrandi, C. Chabert, C. Gillieron, B. Francon, T. Martin, D. Gretener, D. Perrin, D. Leroy, P.A. Vitte, E. Hirsch, M.P. Wymann, R. Cirillo, M.K. Schwarz, and C. Rommel (2005) Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 11:936-943.

Carvalho-Pinto, C., M.I. Garcia, L. Gomez, A. Ballesteros, A. Zaballos, J.M. Flores, M. Mellado, J.M. Rodriguez-Frade, D. Balomenos, and A.C. Martinez (2004) Leukocyte attraction through the CCR5 receptor controls progress from insulinitis to diabetes in non-obese diabetic mice. *Eur J Immunol.* 34:548-557.

Chan, V.W., S. Kothakota, M.C. Rohan, L. Panganiban-Lustan, J.P. Gardner, M.S. Wachowicz, J.A. Winter, and L.T. Williams (1999) Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood.* 93:3610-3616.

Chang, J.D., G.K. Sukhova, P. Libby, E. Schwartz, A.H. Lichtenstein, S.J. Field, C. Kennedy, S. Madhavarapu, J. Luo, D. Wu, and L.C. Cantley (2007) Deletion of the phosphoinositide 3-kinase p110gamma gene attenuates murine atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:8077-8082.

Choi, J.H., C. Cheong, D.B. Dandamudi, C.G. Park, A. Rodriguez, S. Mehandru, K. Velinzon, I.H. Jung, J.Y. Yoo, G.T. Oh, and R.M. Steinman (2011) Flt3 signaling-dependent dendritic cells protect against atherosclerosis. *Immunity.* 35:819-831.

Clayton, E., G. Bardi, S.E. Bell, D. Chantry, C.P. Downes, A. Gray, L.A. Humphries, D. Rawlings, H. Reynolds, E. Vigorito, and M. Turner (2002) A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J Exp Med.* 196:753-763.

Combadiere, C., S. Potteaux, J.L. Gao, B. Esposito, S. Casanova, E.J. Lee, P. Debre, A. Tedgui, P.M. Murphy, and Z. Mallat (2003) Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation.* 107:1009-1016.

Combadiere, C., S. Potteaux, M. Rodero, T. Simon, A. Pezard, B. Esposito, R. Merval, A. Proudfoot, A. Tedgui, and Z. Mallat (2008) Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation.* 117:1649-1657.

Cyster, J.G., K.M. Ansel, K. Reif, E.H. Eklund, P.L. Hyman, H.L. Tang, S.A. Luther, and V.N. Ngo (2000) Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev.* 176:181-193.

de Boer, O.J., J.J. van der Meer, P. Teeling, C.M. van der Loos, and A.C. van der Wal. (2007) Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions. *PLoS One*. 2:e779.

DeGrendele, H.C., P. Estess, and M.H. Siegelman (1997) Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science*. 278:672-675.

Dejardin, E., N.M. Droin, M. Delhase, E. Haas, Y. Cao, C. Makris, Z.W. Li, M. Karin, C.F. Ware, and D.R. Green (2002) The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity*. 17:525-535.

Dil, N., and A.J. Marshall (2009) Role of phosphoinositide 3-kinase p110 delta in TLR4- and TLR9-mediated B cell cytokine production and differentiation. *Mol Immunol*. 46:1970-1978.

Dituri, F., A. Mazzocca, G. Giannelli, and S. Antonaci (2011) PI3K functions in cancer progression, anticancer immunity and immune evasion by tumors. *Clin Dev Immunol*. 2011:947858.

Drechsler, M., R.T. Megens, M. van Zandvoort, C. Weber, and O. Soehnlein (2010) Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation*. 122:1837-1845.

Durand, C.A., K. Hartvigsen, L. Fogelstrand, S. Kim, S. Iritani, B. Vanhaesebroeck, J.L. Witztum, K.D. Puri, and M.R. Gold (2009) Phosphoinositide 3-kinase p110 delta regulates natural antibody production, marginal zone and B-1 B cell function, and autoantibody responses. *J Immunol*. 183:5673-5684.

Dyson, J.M., C.G. Fedele, E.M. Davies, J. Becanovic, and C.A. Mitchell (2012) Phosphoinositide phosphatases: just as important as the kinases. *Subcell Biochem*. 58:215-279.

Eickholt, B.J., A.I. Ahmed, M. Davies, E.A. Papakonstanti, W. Pearce, M.L. Starkey, A. Bilancio, A.C. Need, A.J. Smith, S.M. Hall, F.P. Hamers, K.P. Giese, E.J. Bradbury, and B. Vanhaesebroeck (2007) Control of axonal growth and regeneration of sensory neurons by the p110delta PI 3-kinase. *PLoS One*. 2:e869.

Falk, L.A., and S.N. Vogel (1988) Comparison of bone marrow progenitors responsive to granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor-1. *J Leukoc Biol*. 43:148-157.

Farr, A.G., M.L. Berry, A. Kim, A.J. Nelson, M.P. Welch, and A. Aruffo (1992) Characterization

and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. *J Exp Med*. 176:1477-1482.

Flanagan, K., D. Moroziewicz, H. Kwak, H. Horig, and H.L. Kaufman (2004) The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4⁺ T cells. *Cell Immunol*. 231:75-84.

Fletcher, A.L., V. Lukacs-Kornek, E.D. Reynoso, S.E. Pinner, A. Bellemare-Pelletier, M.S. Curry, A.R. Collier, R.L. Boyd, and S.J. Turley (2010) Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J Exp Med*. 207:689-697.

Fletcher, A.L., D. Malhotra, S.E. Acton, V. Lukacs-Kornek, A. Bellemare-Pelletier, M. Curry, M. Armant, and S.J. Turley (2011) Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. *Front Immunol*. 2:35.

Forster, R., A.C. Davalos-Misilitz, and A. Rot (2008) CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*. 8:362-371.

Fougerat, A., S. Gayral, P. Gourdy, A. Schambourg, T. Ruckle, M.K. Schwarz, C. Rommel, E. Hirsch, J.F. Arnal, J.P. Salles, B. Perret, M. Breton-Douillon, M.P. Wymann, and M. Laffargue (2008) Genetic and pharmacological targeting of phosphoinositide 3-kinase-gamma reduces atherosclerosis and favors plaque stability by modulating inflammatory processes. *Circulation*. 117:1310-1317.

Fruman, D.A. (2004) Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Curr Opin Immunol*. 16:314-320.

Fruman, D.A., L.C. Cantley, and C.L. Carpenter (1996) Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics*. 37:113-121.

Futterer, A., K. Mink, A. Luz, M.H. Kosco-Vilbois, and K. Pfeffer (1998) The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity*. 9:59-70.

Galkina, E., and K. Ley (2009) Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol*. 27:165-197.

Geng, L., J. Tan, E. Himmelfarb, A. Schueneman, K. Niermann, J. Brousal, A. Fu, K. Cuneo, E.A. Kesicki, J. Treiberg, J.S. Hayflick, and D.E. Hallahan (2004) A specific antagonist of the p110delta catalytic component of phosphatidylinositol 3'-kinase, IC486068, enhances radiation-induced tumor vascular destruction. *Cancer Res*. 64:4893-4899.

Gobert Gosse, S., C. Bourgin, W.Q. Liu, C. Garbay, and G. Mouchiroud (2005) M-CSF stimulated differentiation requires persistent MEK activity and MAPK phosphorylation independent of Grb2-Sos association and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell Signal*. 17:1352-1362.

Gollmer, K., F. Asperti-Boursin, Y. Tanaka, K. Okkenhaug, B. Vanhaesebroeck, J.R. Peterson, Y. Fukui, E. Donnadieu, and J.V. Stein (2009) CCL21 mediates CD4⁺ T-cell costimulation via a DOCK2/Rac-dependent pathway. *Blood*. 114:580-588.

Gordon, S., and P.R. Taylor (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 5:953-964.

Gotsman, I., N. Grabie, R. Gupta, R. Dacosta, M. MacConmara, J. Lederer, G. Sukhova, J.L. Witztum, A.H. Sharpe, and A.H. Lichtman (2006) Impaired regulatory T-cell response and enhanced atherosclerosis in the absence of inducible costimulatory molecule. *Circulation*. 114:2047-2055.

Guerreiro, A.S., S. Fattet, D.W. Kulesza, A. Atamer, A.N. Elsing, T. Shalaby, S.P. Jackson, S.M. Schoenwaelder, M.A. Grotzer, O. Delattre, and A. Arcaro (2011) A sensitized RNA interference screen identifies a novel role for the PI3K p110gamma isoform in medulloblastoma cell proliferation and chemoresistance. *Mol Cancer Res*. 9:925-935.

Guillermet-Guibert, J., K. Bjorklof, A. Salpekar, C. Gonella, F. Ramadani, A. Bilancio, S. Meek, A.J. Smith, K. Okkenhaug, and B. Vanhaesebroeck (2008) The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:8292-8297.

Gunn, M.D., S. Kyuwa, C. Tam, T. Kakiuchi, A. Matsuzawa, L.T. Williams, and H. Nakano (1999) Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med*. 189:451-460.

Gunn, M.D., V.N. Ngo, K.M. Ansel, E.H. Ekland, J.G. Cyster, and L.T. Williams (1998) A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*. 391:799-803.

Gunn, M.D., K. Tangemann, C. Tam, J.G. Cyster, S.D. Rosen, and L.T. Williams (1998)b A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:258-263.

Hamilton, J.A. (2008) Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 8:533-544.

Hansson, G.K., and P. Libby (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 6:508-519.

Haralick, R.M., K. Shanmugam, and I. Dinstein (1973) Textural Features for Image Classification. *IEEE Trans Syst Man Cybern.* SMC-3:610-621.

Haylock-Jacobs, S., I. Comerford, M. Bunting, E. Kara, S. Townley, M. Klingler-Hoffmann, B. Vanhaesebroeck, K.D. Puri, and S.R. McColl (2011) PI3Kdelta drives the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting effector T cell apoptosis and promoting Th17 differentiation. *J Autoimmun.* 36:278-287.

Hirsch, E., V.L. Katanaev, C. Garlanda, O. Azzolino, L. Pirola, L. Silengo, S. Sozzani, A. Mantovani, F. Altruda, and M.P. Wymann (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science.* 287:1049-1053.

Honda, K., H. Nakano, H. Yoshida, S. Nishikawa, P. Rennert, K. Ikuta, M. Tamechika, K. Yamaguchi, T. Fukumoto, T. Chiba, and S.I. Nishikawa (2001) Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J Exp Med.* 193:621-630.

Huo, Y., A. Schober, S.B. Forlow, D.F. Smith, M.C. Hyman, S. Jung, D.R. Littman, C. Weber, and K. Ley (2003) Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 9:61-67.

Imai, T., K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiyama, T.J. Schall, and O. Yoshie (1997) Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 91:521-530.

Ishibashi, S., M.S. Brown, J.L. Goldstein, R.D. Gerard, R.E. Hammer, and J. Herz (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest.* 92:883-893.

Janas, M.L., and M. Turner (2011) Interaction of Ras with p110gamma is required for thymic beta-selection in the mouse. *J Immunol.* 187:4667-4675.

Johnson, J.L., and A.C. Newby (2009) Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol.* 20:370-378.

Jones, G.E., E. Prigmore, R. Calvez, C. Hogan, G.A. Dunn, E. Hirsch, M.P. Wymann, and A.J. Ridley (2003) Requirement for PI 3-kinase gamma in macrophage migration to MCP-1 and CSF-1. *Exp Cell Res.* 290:120-131.

Jones, K.L., J.J. Maguire, and A.P. Davenport (2011) Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 162:1453-1469.

Jou, S.T., N. Carpino, Y. Takahashi, R. Piekorz, J.R. Chao, D. Wang, and J.N. Ihle. (2002) Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol.* 22:8580-8591.

Kanagasundaram, V., A. Jaworowski, and J.A. Hamilton (1996) Association between phosphatidylinositol-3 kinase, Cbl and other tyrosine phosphorylated proteins in colony-stimulating factor-1-stimulated macrophages. *Biochem J.* 320 (Pt 1):69-77.

Karlsson, M.C., R. Guinamard, S. Bolland, M. Sankala, R.M. Steinman, and J.V. Ravetch (2003) Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. *J Exp Med.* 198:333-340.

Katakai, T. (2012) Marginal reticular cells: a stromal subset directly descended from the lymphoid tissue organizer. *Front Immunol.* 3:200.

Katakai, T., T. Hara, M. Sugai, H. Gonda, and A. Shimizu (2004) Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med.* 200:783-795.

Katakai, T., H. Suto, M. Sugai, H. Gonda, A. Togawa, S. Suematsu, Y. Ebisuno, K. Katagiri, T. Kinashi, and A. Shimizu (2008) Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J Immunol.* 181:6189-6200.

Kato, J.Y., M. Matsuoka, K. Polyak, J. Massague, and C.J. Sherr (1994) Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell.* 79:487-496.

Kelley, T.W., M.M. Graham, A.I. Doseff, R.W. Pomerantz, S.M. Lau, M.C. Ostrowski, T.F. Franke, and C.B. Marsh (1999) Macrophage colony-stimulating factor promotes cell survival through Akt/protein kinase B. *J Biol Chem.* 274:26393-26398.

Khallou-Laschet, J., A. Varthaman, G. Fornasa, C. Compain, A.T. Gaston, M. Clement, M. Dussiot, O. Levillain, S. Graff-Dubois, A. Nicoletti, and G. Caligiuri (2010) Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One.* 5:e8852.

Khan, O., M. Headley, A. Gerard, W. Wei, L. Liu, and M.F. Krummel (2011) Regulation of T cell priming by lymphoid stroma. *PLoS One.* 6:e26138.

Kim, C.H. (2005) The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. *Curr Opin Hematol.* 12:298-304.

Kim, D., R.E. Mebius, J.D. MacMicking, S. Jung, T. Cupedo, Y. Castellanos, J. Rho, B.R. Wong, R. Josien, N. Kim, P.D. Rennert, and Y. Choi (2000) Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med.* 192:1467-1478.

Kim, M.Y. (2008) Roles of embryonic and adult lymphoid tissue inducer cells in primary and secondary lymphoid tissues. *Yonsei Med J.* 49:352-356.

Kim, M.Y., G. Anderson, A. White, E. Jenkinson, W. Arlt, I.L. Martensson, L. Erlandsson, and P.J. Lane (2005) OX40 ligand and CD30 ligand are expressed on adult but not neonatal CD4+CD3- inducer cells: evidence that IL-7 signals regulate CD30 ligand but not OX40 ligand expression. *J Immunol.* 174:6686-6691.

Kim, M.Y., F.M. Gaspal, H.E. Wiggett, F.M. McConnell, A. Gulbranson-Judge, C. Raykundalia, L.S. Walker, M.D. Goodall, and P.J. Lane (2003) CD4(+)CD3(-) accessory cells costimulate primed CD4 T cells through OX40 and CD30 at sites where T cells collaborate with B cells. *Immunity.* 18:643-654.

Kim, N., A. Saudemont, L. Webb, M. Camps, T. Ruckle, E. Hirsch, M. Turner, and F. Colucci (2007) The p110delta catalytic isoform of PI3K is a key player in NK-cell development and cytokine secretion. *Blood.* 110:3202-3208.

Koni, P.A., R. Sacca, P. Lawton, J.L. Browning, N.H. Ruddle, and R.A. Flavell (1997) Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity.* 6:491-500.

Kriehuber, E., S. Breiteneder-Geleff, M. Groeger, A. Soleiman, S.F. Schoppmann, G. Stingl, D. Kerjaschki, and D. Maurer (2001) Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med.* 194:797-808.

Kunjathoor, V.V., M. Febbraio, E.A. Podrez, K.J. Moore, L. Andersson, S. Koehn, J.S. Rhee, R. Silverstein, H.F. Hoff, and M.W. Freeman (2002) Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem.* 277:49982-49988.

Kyaw, T., P. Tipping, A. Bobik, and B.H. Toh (2012) Protective role of natural IgM-producing B1a cells in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 22:48-53.

Kyaw, T., P. Tipping, B.H. Toh, and A. Bobik (2011) Current understanding of the role of B cell subsets and intimal and adventitial B cells in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 22:373-379.

Lahoute, C., O. Herbin, Z. Mallat, and A. Tedgui (2011) Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol.* 8:348-358.

Lamharzi, N., C.B. Renard, F. Kramer, S. Pennathur, J.W. Heinecke, A. Chait, and K.E. Bornfeldt (2004) Hyperlipidemia in concert with hyperglycemia stimulates the proliferation of macrophages in atherosclerotic lesions: potential role of glucose-oxidized LDL. *Diabetes.* 53:3217-3225.

Lesnik, P., C.A. Haskell, and I.F. Charo (2003) Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest.* 111:333-340.

Li, Z., H. Jiang, W. Xie, Z. Zhang, A.V. Smrcka, and D. Wu (2000) Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science.* 287:1046-1049.

Link, A., T.K. Vogt, S. Favre, M.R. Britschgi, H. Acha-Orbea, B. Hinz, J.G. Cyster, and S.A. Luther (2007) Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol.* 8:1255-1265.

Liu, D., and J.E. Uzonna (2010) The p110 delta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase controls the quality of secondary anti-Leishmania immunity by regulating expansion and effector function of memory T cell subsets. *J Immunol.* 184:3098-3105.

Liu, D., T. Zhang, A.J. Marshall, K. Okkenhaug, B. Vanhaesebroeck, and J.E. Uzonna (2009) The p110delta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase controls susceptibility to Leishmania major by regulating expansion and tissue homing of regulatory T cells. *J Immunol.* 183:1921-1933.

Lopes-Carvalho, T., and J.F. Kearney (2004) Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev.* 197:192-205.

Low, P.C., R. Misaki, K. Schroder, A.C. Stanley, M.J. Sweet, R.D. Teasdale, B. Vanhaesebroeck, F.A. Meunier, T. Taguchi, and J.L. Stow (2010) Phosphoinositide 3-kinase delta regulates membrane fission of Golgi carriers for selective cytokine secretion. *J Cell Biol.* 190:1053-1065.

Lukacs-Kornek, V., D. Malhotra, A.L. Fletcher, S.E. Acton, K.G. Elpek, P. Tayalia, A.R. Collier, and S.J. Turley (2011) Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat Immunol.* 12:1096-1104.

Lukacs-Kornek, V., and S.J. Turley (2011) Self-antigen presentation by dendritic cells and lymphoid stroma and its implications for autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 23:138-145.

Lusis, A.J. (2000) Atherosclerosis. *Nature*. 407:233-241.

Luther, S.A., H.L. Tang, P.L. Hyman, A.G. Farr, and J.G. Cyster (2000) Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:12694-12699.

Martin, A.L., M.D. Schwartz, S.C. Jameson, and Y. Shimizu (2008) Selective regulation of CD8 effector T cell migration by the p110 gamma isoform of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*. 180:2081-2088.

Mebius, R.E. (2003) Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol*. 3:292-303.

Mebius, R.E., and G. Kraal (2005) Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 5:606-616.

Mebius, R.E., P. Rennert, and I.L. Weissman (1997) Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity*. 7:493-504.

Mitchell, J. (1973) Lymphocyte circulation in the spleen. Marginal zone bridging channels and their possible role in cell traffic. *Immunology*. 24:93-107.

Moore, K.J., and I. Tabas (2011) Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 145:341-355.

Mor, A., D. Planer, G. Luboshits, A. Afek, S. Metzger, T. Chajek-Shaul, G. Keren, and J. George (2007) Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27:893-900.

Mueller, S.N., and R. Ahmed (2008) Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses. *Immunol Rev*. 224:284-294.

Mueller, S.N., and R.N. Germain (2009) Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 9:618-629.

Munugalavadla, V., J. Borneo, D.A. Ingram, and R. Kapur (2005) p85alpha subunit of class IA PI-3 kinase is crucial for macrophage growth and migration. *Blood*. 106:103-109.

Nolte, M.A., R. Arens, M. Kraus, M.H. van Oers, G. Kraal, R.A. van Lier, and R.E. Mebius (2004) B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. *J Immunol*. 172:3620-3627.

Oak, J.S., M.P. Matheu, I. Parker, M.D. Cahalan, and D.A. Fruman (2007) Lymphocyte

cell motility: the twisting, turning tale of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem Soc Trans.* 35:1109-1113.

Okkenhaug, K., K. Ali, and B. Vanhaesebroeck (2007) Antigen receptor signalling: a distinctive role for the p110delta isoform of PI3K. *Trends Immunol.* 28:80-87.

Okkenhaug, K., A. Bilancio, G. Farjot, H. Priddle, S. Sancho, E. Peskett, W. Pearce, S.E. Meek, A. Salpekar, M.D. Waterfield, A.J. Smith, and B. Vanhaesebroeck (2002) Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science.* 297:1031-1034.

Okkenhaug, K., D.T. Patton, A. Bilancio, F. Garcon, W.C. Rowan, and B. Vanhaesebroeck (2006) The p110delta isoform of phosphoinositide 3-kinase controls clonal expansion and differentiation of Th cells. *J Immunol.* 177:5122-5128.

Okkenhaug, K., and B. Vanhaesebroeck (2003) PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol.* 3:317-330.

Oudit, G.Y., H. Sun, B.G. Kerfant, M.A. Crackower, J.M. Penninger, and P.H. Backx (2004) The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol.* 37:449-471.

Papakonstanti, E.A., O. Zwaenepoel, A. Bilancio, E. Burns, G.E. Nock, B. Houseman, K. Shokat, A.J. Ridley, and B. Vanhaesebroeck (2008) Distinct roles of class IA PI3K isoforms in primary and immortalised macrophages. *J Cell Sci.* 121:4124-4133.

Patton, D.T., O.A. Garden, W.P. Pearce, L.E. Clough, C.R. Monk, E. Leung, W.C. Rowan, S. Sancho, L.S. Walker, B. Vanhaesebroeck, and K. Okkenhaug (2006) Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110 delta is critical for the function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 177:6598-6602.

Pearson, K. (1901) On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space *Philos Mag.* 2:559-572.

Pellas, T.C., and L. Weiss. (1990) Deep splenic lymphatic vessels in the mouse: a route of splenic exit for recirculating lymphocytes. *Am J Anat.* 187:347-354.

Perino, A., A. Ghigo, E. Ferrero, F. Morello, G. Santulli, G.S. Baillie, F. Damilano, A.J. Dunlop, C. Pawson, R. Walser, R. Levi, F. Altruda, L. Silengo, L.K. Langeberg, G. Neubauer, S. Heymans, G. Lembo, M.P. Wymann, R. Wetzker, M.D. Houslay, G. Iaccarino, J.D. Scott, and E. Hirsch (2011) Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110gamma. *Mol Cell.* 42:84-95.

Puri, K.D., T.A. Doggett, J. Douangpanya, Y. Hou, W.T. Tino, T. Wilson, T. Graf, E. Clayton, M. Turner, J.S. Hayflick, and T.G. Diacovo (2004) Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood*. 103:3448-3456.

Puri, K.D., and M.R. Gold (2012) Selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase delta: modulators of B-cell function with potential for treating autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *Front Immunol*. 3:256.

Rajavashisth, T.B., A. Andalibi, M.C. Territo, J.A. Berliner, M. Navab, A.M. Fogelman, and A.J. Lusis (1990) Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 344:254-257.

Randis, T.M., K.D. Puri, H. Zhou, and T.G. Diacovo (2008) Role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils. *Eur J Immunol*. 38:1215-1224.

Rehm, A., A. Mensen, K. Schradi, K. Gerlach, S. Wittstock, S. Winter, G. Buchner, B. Dorken, M. Lipp, and U.E. Hopken (2011) Cooperative function of CCR7 and lymphotoxin in the formation of a lymphoma-permissive niche within murine secondary lymphoid organs. *Blood*. 118:1020-1033.

Reif, K., K. Okkenhaug, T. Sasaki, J.M. Penninger, B. Vanhaesebroeck, and J.G. Cyster (2004) Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol*. 173:2236-2240.

Rock, C.O., J.L. Cleveland, and S. Jackowski (1992) Macrophage growth arrest by cyclic AMP defines a distinct checkpoint in the mid-G1 stage of the cell cycle and overrides constitutive c-myc expression. *Mol Cell Biol*. 12:2351-2358.

Rodriguez-Borlado, L., D.F. Barber, C. Hernandez, M.A. Rodriguez-Marcos, A. Sanchez, E. Hirsch, M. Wymann, A.C. Martinez, and A.C. Carrera (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the CD4/CD8 T cell differentiation ratio. *J Immunol*. 170:4475-4482.

Rolf, J., S.E. Bell, D. Kovesdi, M.L. Janas, D.R. Soond, L.M. Webb, S. Santinelli, T. Saunders, B. Hebeis, N. Killeen, K. Okkenhaug, and M. Turner (2010) Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction. *J Immunol*. 185:4042-4052.

Roozendaal, R., T.R. Mempel, L.A. Pitcher, S.F. Gonzalez, A. Verschoor, R.E. Mebius, U.H. von Andrian, and M.C. Carroll (2009) Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity*. 30:264-276.

Rosati, E., L. Scaringi, P. Cornacchione, K. Fettucciari, R. Sabatini, R. Rossi, and P. Marconi (1995) Cytokine response to inactivated *Candida albicans* in mice. *Cell Immunol.* 162:256-264.

Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340:115-126.

Ruffell, D., F. Mourkioti, A. Gambardella, P. Kirstetter, R.G. Lopez, N. Rosenthal, and C. Nerlov (2009) A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:17475-17480.

Sakai, M., S. Kobori, A. Miyazaki, and S. Horiuchi (2000) Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 11:503-509.

Saleem, A., S. Kharbanda, Z.M. Yuan, and D. Kufe (1995) Monocyte colony-stimulating factor stimulates binding of phosphatidylinositol 3-kinase to Grb2.Sos complexes in human monocytes. *J Biol Chem.* 270:10380-10383.

Sallusto, F., and A. Lanzavecchia (2001) Exploring pathways for memory T cell generation. *J Clin Invest.* 108:805-806.

Saraste, A. (1999) Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz.* 24:189-195.

Sasaki, T., J. Irie-Sasaki, R.G. Jones, A.J. Oliveira-dos-Santos, W.L. Stanford, B. Bolon, A. Wakeham, A. Itie, D. Bouchard, I. Kozieradzki, N. Joza, T.W. Mak, P.S. Ohashi, A. Suzuki, and J.M. Penninger (2000) Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science.* 287:1040-1046.

Saudemont, A., F. Garcon, H. Yadi, M. Roche-Molina, N. Kim, A. Segonds-Pichon, A. Martin-Fontecha, K. Okkenhaug, and F. Colucci (2009) p110gamma and p110delta isoforms of phosphoinositide 3-kinase differentially regulate natural killer cell migration in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:5795-5800.

Sawyer, C., J. Sturge, D.C. Bennett, M.J. O'Hare, W.E. Allen, J. Bain, G.E. Jones, and B. Vanhaesebroeck (2003) Regulation of breast cancer cell chemotaxis by the phosphoinositide 3-kinase p110delta. *Cancer Res.* 63:1667-1675.

Scandella, E., B. Bolinger, E. Lattmann, S. Miller, S. Favre, D.R. Littman, D. Finke, S.A. Luther, T. Junt, and B. Ludewig (2008) Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nat Immunol.* 9:667-675.

Scaringi, L., E. Rosati, P. Cornacchione, K. Fettucciari, R. Sabatini, R. Biondi, L.

Mezzasoma, M. Valiani, P. D'Errico, and P. Marconi (1995) Local and systemic immune response to inactivated *Candida albicans* in mice. *Nat Immun.* 14:234-249.

Schmid, M.C., C.J. Avraamides, H.C. Dippold, I. Franco, P. Foubert, L.G. Ellies, L.M. Acevedo, J.R. Manglicmot, X. Song, W. Wrasidlo, S.L. Blair, M.H. Ginsberg, D.A. Cheres, E. Hirsch, S.J. Field, and J.A. Varner (2011) Receptor tyrosine kinases and TLR/IL1Rs unexpectedly activate myeloid cell PI3kgamma, a single convergent point promoting tumor inflammation and progression. *Cancer Cell.* 19:715-727.

Schulz, C., A. Schafer, M. Stolla, S. Kerstan, M. Lorenz, M.L. von Bruhl, M. Schiemann, J. Bauersachs, T. Gloe, D.H. Busch, M. Gawaz, and S. Massberg (2007) Chemokine fractalkine mediates leukocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in flowing whole blood: a critical role for P-selectin expressed on activated platelets. *Circulation.* 116:764-773.

Seimon, T., and I. Tabas (2009) Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 50 Suppl:S382-387.

Siebert, S., H.Y. Huang, C.Y. Yang, L. Scarpellino, L. Carrie, S. Essex, P.J. Nelson, M. Heikenwalder, H. Acha-Orbea, C.D. Buckley, B.J. Marsland, D. Zehn, and S.A. Luther (2011) Fibroblastic reticular cells from lymph nodes attenuate T cell expansion by producing nitric oxide. *PLoS One.* 6:e27618.

Siebert, S., and S.A. Luther (2012) Positive and negative regulation of T cell responses by fibroblastic reticular cells within paracortical regions of lymph nodes. *Front Immunol.* 3:285.

Smit, M.J., P. Verdijk, E.M. van der Raaij-Helmer, M. Navis, P.J. Hensbergen, R. Leurs, and C.P. Tensen (2003) CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood.* 102:1959-1965.

So, L., and D.A. Fruman (2012) PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: new developments and therapeutic advances. *Biochem J.* 442:465-481.

Stephens, L.R., A. Eguinoa, H. Erdjument-Bromage, M. Lui, F. Cooke, J. Coadwell, A.S. Smrcka, M. Thelen, K. Cadwallader, P. Tempst, and P.T. Hawkins (1997) The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell.* 89:105-114.

Sun, J., G.K. Sukhova, P.J. Wolters, M. Yang, S. Kitamoto, P. Libby, L.A. MacFarlane, J. Mallen-St Clair, and G.P. Shi (2007) Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med.* 13:719-724.

Swirski, F.K., P. Libby, E. Aikawa, P. Alcaide, F.W. Luscinskas, R. Weissleder, and M.J. Pittet (2007) Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest.* 117:195-205.

Swirski, F.K., and M. Nahrendorf (2013) Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science.* 339:161-166.

Tabas, I. (2005) Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:2255-2264.

Tacke, F., D. Alvarez, T.J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, S.A. Lira, A.J. Habenicht, and G.J. Randolph (2007) Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 117:185-194.

Tan, J.K., and T. Watanabe (2010) Artificial engineering of secondary lymphoid organs. *Adv Immunol.* 105:131-157.

Tassi, I., M. Cella, S. Gilfillan, I. Turnbull, T.G. Diacovo, J.M. Penninger, and M. Colonna (2007) p110gamma and p110delta phosphoinositide 3-kinase signaling pathways synergize to control development and functions of murine NK cells. *Immunity.* 27:214-227.

Thomas, M.S., J.S. Mitchell, C.C. DeNucci, A.L. Martin, and Y. Shimizu (2008) The p110gamma isoform of phosphatidylinositol 3-kinase regulates migration of effector CD4 T lymphocytes into peripheral inflammatory sites. *J Leukoc Biol.* 84:814-823.

van den Berg, T.K., M. van der Ende, E.A. Dopp, G. Kraal, and C.D. Dijkstra (1993) Localization of beta 1 integrins and their extracellular ligands in human lymphoid tissues. *Am J Pathol.* 143:1098-1110.

van Wanrooij, E.J., S.C. de Jager, T. van Es, P. de Vos, H.L. Birch, D.A. Owen, R.J. Watson, E.A. Biessen, G.A. Chapman, T.J. van Berkel, and J. Kuiper (2008) CXCR3 antagonist NBI-74330 attenuates atherosclerotic plaque formation in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:251-257.

Vanhaesebroeck, B., K. Ali, A. Bilancio, B. Geering, and L.C. Foukas (2005) Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci.* 30:194-204.

Vanhaesebroeck, B., J. Guillermet-Guibert, M. Graupera, and B. Bilanges (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:329-341.

Vanhaesebroeck, B., G.E. Jones, W.E. Allen, D. Zicha, R. Hooshmand-Rad, C. Sawyer,

C. Wells, M.D. Waterfield, and A.J. Ridley (1999) Distinct PI(3)Ks mediate mitogenic signalling and cell migration in macrophages. *Nat Cell Biol.* 1:69-71.

Varticovski, L., B. Druker, D. Morrison, L. Cantley, and T. Roberts (1989) The colony stimulating factor-1 receptor associates with and activates phosphatidylinositol-3 kinase. *Nature.* 342:699-702.

Voigt, P., C. Brock, B. Nurnberg, and M. Schaefer (2005) Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Biol Chem.* 280:5121-5127.

Voigt, P., M.B. Dorner, and M. Schaefer (2006) Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J Biol Chem.* 281:9977-9986.

Weber, C., and H. Noels (2011) Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 17:1410-1422.

Witztum, J.L., and W. Palinski (1999) Are immunological mechanisms relevant for the development of atherosclerosis? *Clin Immunol.* 90:153-156.

Wolf, B.B., M. Schuler, F. Echeverri, and D.R. Green (1999) Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem.* 274:30651-30656.

Xaus, J., A.F. Villedor, M. Cardo, L. Marques, J. Beleta, J.M. Palacios, and A. Celada (1999) Adenosine inhibits macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation of macrophages through the induction of p27kip-1 expression. *J Immunol.* 163:4140-4149.

Xie, J.H., N. Nomura, M. Lu, S.L. Chen, G.E. Koch, Y. Weng, R. Rosa, J. Di Salvo, J. Mudgett, L.B. Peterson, L.S. Wicker, and J.A. DeMartino (2003) Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *J Leukoc Biol.* 73:771-780.

Yao, W., K. Li, and K. Liao (2009) Macropinocytosis contributes to the macrophage foam cell formation in RAW264.7 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 41:773-780.

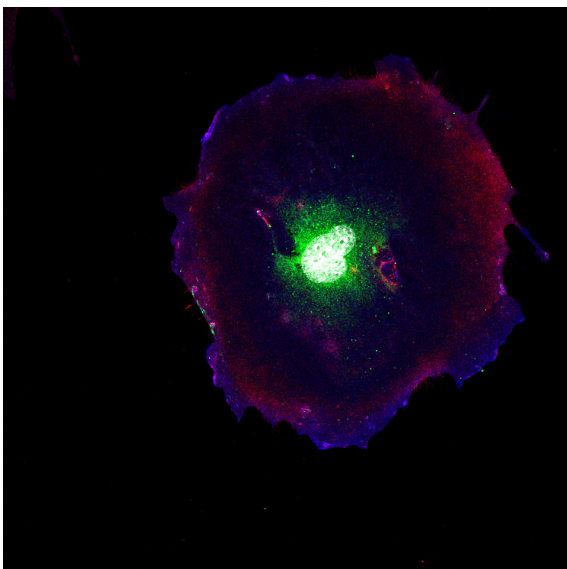
Yusoff, P., J.A. Hamilton, R.D. Nolan, and W.A. Phillips (1994) Haematopoietic colony stimulating factors CSF-1 and GM-CSF increase phosphatidylinositol 3-kinase activity in murine bone marrow-derived macrophages. *Growth Factors.* 10:181-192.

Zernecke, A., E. Shagdarsuren, and C. Weber (2008) Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:1897-1908.

Zwaenepoel, O., N. Tzenaki, A. Vergetaki, A. Makrigiannakis, B. Vanhaesebroeck, and E.A. Papakonstanti (2012) Functional CSF-1 receptors are located at the nuclear envelope and activated via the p110delta isoform of PI 3-kinase. *FASEB J.* 26:691-706.

Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores.

Julius Robert Oppenheimer (1904-1967)



ANEXO

Relación de artículos enviados para publicar

1- Zotes TM, Arias CF, Fuster JJ, Pérez-Yagüe S, Spada R, Hirsch E, Wymann M, Carrera AC, Andrés V, Barber DF. PI3K p110 γ deletion attenuates murine atherosclerosis by reducing macrophage proliferation but not polarization in lesions. PLoSOne. 2012. Manuscript number: PONE-D-12-34617.

2- Zotes TM, Pérez-Yagüe S, Sorzano CO, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, Carrera AC, Barber DF. PI3K p110 δ is expressed in gp38⁺ stromal cells from secondary lymphoid organs and contributes to stromal cell distribution. PLoSOne. 2012. Manuscript number: PONE-D-13-00067.

□

PI3K p110 γ deletion attenuates murine atherosclerosis by reducing macrophage proliferation but not polarization in lesions

Teresa M. Zotes^{1#}, Cristina F. Arias^{1# \times} , José J. Fuster^{2¶}, Sonia Pérez-Yagüe¹, Roberto Spada¹, Emilio Hirsch³, Matthias Wymann⁴, Ana C. Carrera¹, Vicente Andrés² and Domingo F. Barber^{1,*}

¹Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Darwin 3, Campus de Cantoblanco 28049, Madrid, Spain; ²Department of Epidemiology, Atherothrombosis and Imaging, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), 28029, Madrid, Spain; ³Department of Genetics, Biology and Biochemistry, Center for Molecular Biotechnology, University of Torino, Torino I-10126, Italy; ⁴Department of Clinical and Biological Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, University of Basel, Basel CH-4058, Switzerland

*Corresponding author: Darwin, 3; Campus de Cantoblanco; 28049 Madrid, Spain

Tel: +34 91/5855307; Fax: +34 91/3720493; E-mail: dfbarber@cnb.csic.es

#These authors contributed equally to this work.

\times Current address: NYU Langone Medical Center, New York, NY 10010 USA

¶Current address: Whitaker Cardiovascular Institute, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118 USA

Abstract

Atherosclerosis is an inflammatory disease regulated by infiltrating monocytes and T cells, among other cell types. Macrophage number in atherosclerotic lesions is controlled by monocyte migration to plaque, by *in situ* macrophage proliferation, and by macrophage apoptosis. Macrophage differentiation to an inflammatory (M1) or anti-inflammatory phenotype (M2) is also implicated in atherosclerosis progression. We studied the role of phosphoinositol-3-kinase (PI3K) p110 γ in the regulation of apoptosis, macrophage proliferation and polarization towards M1 or M2 phenotypes in atherosclerotic lesions. We analyzed atherosclerosis development in LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice, and performed expression and functional assays in tissues and primary cells from these and from p110 γ ^{+/-} and p110 γ ^{-/-} mice. Atherosclerotic plaques in fat-fed LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice were smaller and had reduced immune cell infiltration compared with LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} controls, which coincided with decreased macrophage proliferation in atherosclerotic lesions of LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice. This proliferation defect was also observed in p110 γ ^{-/-} bone marrow-derived macrophages (BMM) stimulated with macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), and was associated with higher intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels. In contrast, T cell proliferation was unaffected in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice. Moreover, p110 γ deficiency did not affect macrophage polarization towards the M1 or M2 phenotypes in atherosclerotic plaques and cultured BMM. Our results suggest that higher cAMP levels and the ensuing inhibition of macrophage proliferation contribute to atheroprotection in LDLR^{-/-} mice lacking p110 γ . Nonetheless, p110 γ deletion does not appear to be involved in apoptosis, in macrophage polarization or in T cell proliferation.

1. Introduction

Atherosclerosis has traditionally been considered a disorder of cholesterol metabolism that results in lipid accumulation in the arterial wall, provoking artery wall thickening. It shares features of chronic inflammatory diseases, such as infiltration of activated immune cells into the artery wall [1], [2]. Early in the disease, oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) that have accumulated in the intima activate endothelial cells; these secrete a number of pro-inflammatory molecules that recruit specific leukocyte types into the artery wall [3]. Monocyte/macrophages accumulate preferentially in atherosclerotic plaque, although other infiltrate components such as T cells, mast cells, dendritic cells and neutrophils also contribute to inflammation [3], [4], [5]. In early atherosclerotic lesions, most monocytes differentiate to macrophages due to the effect of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and other mediators of innate and acquired immunity [6]. Neointimal macrophages internalize lipoproteins to become foam cells, which contribute to lipoprotein modification and retention, enhancing atherosclerosis progression [4], [6]. Macrophage and T lymphocyte activation lead to the release of additional mediators, including cytokines, chemokines and growth factors [7], [1]. This chronic inflammatory environment promotes progression of early lesions (or fatty streaks) to complex lesions (or advanced plaques), that protrude into the arterial lumen and can trigger atherothrombotic vascular disease [1]. Macrophages are a heterogeneous cell population, able to adapt their physiology in response to a variety of microenvironmental situations. There are thought to be two main phenotypes; classically activated macrophages (M1) are pro-inflammatory, whereas alternatively-activated macrophages (M2) contribute to wound healing and regulation of inflammatory processes [8]. Granulocyte and macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-stimulated bone marrow precursors generate cells of the M1 phenotype, whereas M-CSF promotes the M2 phenotype [9], [10]; studies describe both cell types in human and murine atherosclerotic lesions [11]. A recent report nonetheless showed predominance of infiltrating M2 macrophages in lesions in young apolipoprotein E (ApoE)-deficient mice, while M1 macrophages dominated in those of aged ApoE-deficient mice;

further analysis suggested M2-to-M1 transition in the lesions [12].

Macrophage number in the lesions is controlled by monocyte migration into plaques, by macrophage apoptosis and by local macrophage proliferation [13], [14], [15]. Macrophage apoptosis has contrasting roles in plaque progression; in early lesions, it limits lesion cellularity, whereas in advanced lesions, it promotes development of the necrotic core, a high-risk factor for thrombosis [15]. Proliferation of infiltrating macrophages in early atherosclerotic plaque fosters lesion progression to a more advanced stage [13], [14], [16]. Atherogenesis is triggered by autocrine and paracrine stimulation of macrophage proliferation [14], [17]. Vascular endothelial and smooth muscle cells in these lesions secrete GM-CSF in response to modified LDL [17]. In addition, modified LDL that accumulates in these lesions is recognized by distinct types of surface receptors on infiltrating macrophages, leading to GM-CSF release, which activates macrophage proliferation [16], [18]. Although models of macrophage proliferation in lesions based on *in vitro* experiments implicate GM-CSF and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activity in macrophage proliferation [14], [16], [19], Chang *et al.* did not detect GM-CSF by *in situ* hybridization in atherosclerotic plaque sections from ApoE-deficient mice [20].

M-CSF secreted by aortic endothelial cells also promotes macrophage proliferation in atherosclerotic lesions [13]. M-CSF treatment induces tyrosine phosphorylation of its receptor (M-CSFR) and recruitment of the PI3K p85 regulatory subunit to the receptor [21], [22]. p85 α is phosphorylated in tyrosine after M-CSF stimulation in macrophage cell lines, murine bone marrow-derived macrophages (BMM) [23] and human monocytes [22], [24]. In BMM from p85 α -deficient mice, cell proliferation as well as activation of early M-CSFR signaling (including Akt phosphorylation) are reduced in response to M-CSF, suggesting a class I_A PI3K contribution to this process [25]. M-CSF induces PI3K activity in macrophages [26]; the p110 α catalytic subunit is responsible for M-CSF-mediated proliferation [27]. It seems unlikely that the class I_B PI3K catalytic subunit p110 γ contributes to this early M-CSF signaling, as there are no differences in M-CSF-induced early signaling in p110 γ -deficient BMM [28].

p110 γ is expressed mainly in hematopoietic cells. p110 γ ^{-/-} mouse neutrophils have severely impaired function and migration; these mice also show reduced mast cell degranulation [29], lower thymocyte numbers and defective T cell function *in vitro* and *in vivo* [30], [31], [32]. These defects suggest the potential of p110 γ inhibition as a therapeutic target for autoimmune and inflammatory disease treatment. Germ-line deletion of p110 γ in ApoE^{-/-} mice attenuates murine atherosclerosis [20]. *In vitro* and *in vivo* experiments showed that p110 γ is necessary for Akt activation in macrophages in response to oxLDL, atherogenic chemokines, and angiotensin II activation [20]. Pharmacological inhibition of p110 γ alleviates atherosclerotic plaque development in ApoE^{-/-} and LDLR^{-/-} mice; its deletion in hematopoietic cells decreases macrophage and T cell numbers in plaque [33]. The *in vivo* mechanism underlying this reduced inflammatory cell infiltration has not been entirely clarified. Although M-CSF-stimulated p110 γ -deficient BMM show reduced migration rates *in vitro* [28], p110 γ deletion does not affect monocyte differentiation to macrophages [34]. p110 γ regulates cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels in cardiomyocytes through a kinase-independent pathway, including interaction of p110 γ and its p84/p87^{PIKAP} regulatory subunit with protein kinase A (PKA); PKA activates phosphodiesterase3B (PDE3B), thus inducing cAMP degradation [35], [36]. It is not known whether p110 γ regulates cAMP intracellular levels in macrophages. Macrophage proliferation is nonetheless affected by intracellular cAMP levels, as high levels are associated with cell cycle arrest [37]. In addition, cAMP response element binding protein (CREB) is linked to macrophage polarization to the M2 phenotype, thus connecting cAMP and M1/M2 macrophage polarization [38].

Although some progress has been made in atherosclerosis prevention and treatment, mainly by modulation of cholesterol or triglyceride metabolism, its complications remain the leading cause of death in developed countries, and the second most common worldwide. The recent description of the mechanisms that regulate leukocyte migration and infiltration, as well as their proliferation in the lesions, led to attempts to develop treatments that regulate these processes in atherosclerosis. Here we examined the influence

of p110 γ deletion on macrophage proliferation and polarization in atherosclerotic plaque, and tested whether p110 γ deletion reduces lesions in LDLR^{-/-} mice. We identify a role for p110 γ in macrophage proliferation within atherosclerotic lesions, a mechanism that could control plaque size in conjunction with immune cell infiltration.

2. Materials and methods

2.1 Mice and ethics statement

Gene targeting in embryonic cells was used to generate LDLR^{-/-} mice [39] (Ldlr^{tm1Her} version2; Jackson Laboratories). p110γ^{+/-} mice [40] were maintained in heterozygosity. We backcrossed LDLR^{-/-} with p110γ^{+/-} and p110γ^{-/-} mice for at least 7 generations; 12- to 15-week-old mice were fed for two months with a high-fat diet (15.2% fat, containing 7.5 g/kg cholesterol (0.75% cholesterol); Ssniff Spezialdiäten GmbH). Mice were bred and maintained in specific pathogen-free conditions in our animal facility; the CNB Ethics Committee for Animal Experimentation approved all animal studies (ref: 11021), in compliance with national and European Union legislation (Directive 2010/63/EU).

2.2 Analysis of macrophage and T cell infiltration in atherosclerotic lesions

At t = 2 months of high-fat diet, mice were anesthetized (ketamine, 150 mg/kg; xylazine, 10 mg/kg; i.p.). Tail- and toe-pinch reflexes were tested to monitor adequacy of anesthesia and all efforts were made to minimize suffering. Whole blood was extracted by retro-orbital bleeding and hearts perfused with 4% paraformaldehyde. Hearts were extracted and paraffin-embedded. Some serial sections were stained by immunohistochemistry for T cells (CD3⁺) and macrophages (Mac-3⁺) (see Supporting information online for details).

2.3 *In vivo* determination of macrophage and T cell proliferation

Macrophage and T cell proliferation was analyzed by immunofluorescence staining of the aortic valve region in paraffin-embedded sections from LDLR^{-/-}p110γ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110γ^{-/-} mice fed with a high-fat diet for two months. Markers were Mac-3 (macrophages), CD3 (T cells) and Ki67 (proliferation) (details in Supporting information online).

2.4 *In vivo* study of M1 and M2 macrophages

M1 (Mac-3⁺iNOS⁺) and M2 (Mac-3⁺arginase1⁺) macrophages were analyzed by

immunofluorescence staining of paraffin-embedded sections of the aortic valve region from LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} and LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mice after a two-month high-fat diet (see Supporting information online).

2.5 *In vivo* determination of lesion apoptosis

Lesion apoptosis was analyzed by TUNEL and cleaved caspase-3 immunofluorescence staining of the aortic valve region in paraffin-embedded sections from LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} and LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mice fed a high-fat diet for two months (details in Supporting information online).

2.6 Macrophage cell cycle analysis

BMM were synchronized in G0/G1 by M-CSF deprivation (36 h) and then stimulated for different times with M-CSF, collected and labeled with propidium iodide to analyze cell cycle by flow cytometry (see Supporting information online).

2.7 Analysis of intracellular cAMP concentrations by Western blot

BMM were *in vitro* differentiated and M-CSF-stimulated at several times (0, 24 and 48 h). Cells were washed in PBS, lysed in lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% (w/v) Triton X-100, 137 mM NaCl and 5% glycerol, supplemented with phosphatase and protease inhibitors (Sigma, St. Louis, MO)). Protein was quantified with the Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA). Samples were analyzed in 12% SDS-PAGE, and cAMP expression detected in Western blot with anti-cAMP (ab-24851, Abcam, Cambridge, UK) and ECL (Amersham, Barcelona, Spain). β-actin was analyzed as loading control (anti-β-actin clone AC-15, Sigma); for quantification, we used ImageJ software.

2.8 M1 and M2 macrophage differentiation

After BMM differentiation (see Supporting information), cells were plated in 6-well plates (1-2 x 10⁶ cells/well) and incubated (24 h) in complete DMEM (10%

FBS, antibiotics, 2 mM glutamine) and 10 ng/ml IL-4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) for M2 macrophage differentiation, or 10 ng/ml IFN γ (Peprotech) and 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS; Sigma) for M1 macrophage differentiation. Cells were washed in cold PBS, resuspended in 0.6 to 1 ml TRI Reagent (Sigma), and stored at -80°C for RNA extraction.

2.9 qRT-PCR analysis of M1 and M2 macrophage marker expression

RNA was extracted from M1- or M2-differentiated BMM from p110 $\gamma^{+/-}$ and p110 $\gamma^{-/-}$ mice. qRT-PCR was performed using specific primers for M1 (iNOS, IL-12) and M2 markers (arginase1, YM1, IL-10) (see Supporting information online).

2.10 Statistical analysis

Data are represented as mean \pm SD. Most statistical analyses were performed using Student's *t*-test to compare distinct parameters in two independent mouse groups (LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{+/-}$ and LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{-/-}$ or p110 $\gamma^{+/-}$ and p110 $\gamma^{-/-}$). Where indicated, data obtained by counting and small sample analysis were compared by the Poisson test. In all cases, differences were considered significant for $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3. Results

3.1 Lack of p110 γ in LDLR $^{-/-}$ mice reduces atherosclerosis burden and affects immune cell infiltration into atherosclerotic lesions

To determine the effect of PI3K p110 γ deletion on apoptosis, macrophage proliferation and polarization in atherosclerotic lesions, we generated LDLR $^{-/-}$ mice lacking one (LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{+/-}$) or both p110 γ alleles (LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{-/-}$). Mice of both genotypes were fed a high-fat diet for two months to induce the disease. To evaluate the infiltration of macrophages, T cells and regulatory T cells in p110 γ deletion conditions, we stained aortic sinus sections from these mice with macrophage-, T cell- and Treg-specific markers (Mac-3 $^{+}$, CD3 $^{+}$ and Foxp3 $^{+}$, respectively). We observed a significant decrease in Mac-3 $^{+}$ -stained area in LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{-/-}$ compared to LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{+/-}$ lesions (Figure 1A, B). The absolute number of

CD3⁺ T cells was similarly reduced in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} compared to LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} lesions (Figure 1C). Foxp3⁺ staining was negligible in LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} lesions (0-3 cells/section) and absent in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} lesions ($n = 8$ mice/genotype, Table 1).

3.2 p110 γ deficiency reduces macrophage but not T cell proliferation in atherosclerotic lesions

We performed double immunofluorescence experiments in aortic cross-sections from high-fat diet-fed mice to determine whether reduced Mac-3-stained area and lower T cell numbers in atherosclerotic lesions from LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice correlated with reduced cell proliferation (as assessed by Ki67 expression). These studies showed a significant reduction in the number of proliferating neointimal macrophages in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} compared to LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} mice (Figure 2A, B). In contrast, p110 γ deletion did not affect T cell proliferation (Figure 2C).

M-CSF is thought to play an important role in inducing macrophage proliferation in atherosclerotic lesions [13]. In cell cycle assays with *in vitro*-differentiated BMM from LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice, we analyzed the proportion of cells in G0/G1, S and G2/M phases at various times post-stimulation with M-CSF. The proportion of S phase cells was reduced in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} compared to LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} macrophages at 26 h after M-CSF-stimulation (Figure 2D), suggesting a role for p110 γ in macrophage cell cycle progression. In contrast, cell cycle assays to study *in vitro* BMM proliferation in response to GM-CSF showed no differences between p110 γ ^{+/-} and p110 γ ^{-/-} BMM (Figure S2).

3.3 Lesion apoptosis is unaffected by p110 γ deletion

We measured total apoptosis in lesions by TUNEL (Figure 3A) and cleaved caspase-3 (Figure 3B) immunofluorescent staining of aortic sinus sections from LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice. Lesion area was delimited for TUNEL staining with the help of smooth muscle cells (SMC), which limit lesion area and are autofluorescent, and for

cleaved caspase-3 staining by adding Mac-3 staining to the SMC guide; some lesion apoptotic cells are not Mac-3⁺. We detected a tendency toward lower apoptotic rates in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} compared to LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} mice (Figure 3A, B), although the differences were not significant.

3.4 Increased intracellular cAMP levels correlate with reduced LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} macrophage proliferation

Since p110 γ regulates these levels in cardiomyocytes [35], [36], we tested whether this is also the case in macrophages by measuring intracellular cAMP in LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mouse BMM. Using Western blot to detect cAMP in BMM lysates from these mice, we found that cAMP levels at 0 and 48 h after M-CSF stimulation were higher for LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} than for LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} mice (Figure 4A, B). Cell cycle arrest in G0/G1 in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mouse BMM (Figure 2D) thus appeared to correlate with cAMP intracellular levels (Figure 4A, B) after M-CSF stimulation.

3.5 p110 γ deficiency does not affect macrophage polarization to M1 and M2 phenotypes

cAMP is linked to macrophage transition to the M2 phenotype [38]. As we observed increased cAMP levels in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} BMM, we analyzed macrophage polarization in atherosclerotic lesions. Immunofluorescence experiments showed no significant differences in the percentage of M1 (iNOS⁺) and M2 (arginase1⁺) macrophages in aortic sinus cross-sections from LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice (Figure 5A, B), although there was a tendency toward more M2 macrophages in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice. Consistent with this finding, qRT-PCR studies of p110 γ ^{+/-} and p110 γ ^{-/-} mouse BMM stimulated *in vitro* (24 h) towards the M1 (IFN γ + LPS) or M2 phenotypes (IL-4) showed no differences in M1 (iNOS, IL-12) and M2 (arginase1, IL-10, YM1) marker expression (Figure 5C, D).

4. Discussion

Macrophage number in atherosclerotic lesions is controlled by monocyte migration and infiltration into lesions, by local macrophage proliferation, and by apoptosis. PI3K p110 γ is implicated in atherosclerosis, as its genetic deletion in ApoE^{-/-} mice leads to reduced plaque size and impaired activation of the PI3K/Akt pathway in neointimal macrophages [20]. Pharmacological inhibition of p110 γ reduces atherosclerosis in ApoE^{-/-} and LDLR^{-/-} mice, and reconstitution of LDLR^{-/-} mice with p110 γ ^{-/-} mouse bone marrow leads to decreased T cell and monocyte infiltration in atherosclerotic plaques [33]. Whether p110 γ deletion also contributes to local macrophage proliferation and apoptosis nonetheless remains unclear, as does the role of p110 γ in M1/M2 macrophage differentiation. In this study, we approached both questions by analyzing atherosclerosis development in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice.

Immune cell infiltration is an important step in plaque formation and progression [5]. In agreement with previous studies [20], [33], we found smaller aortic sinus lesions in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} than in LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} mice (Figure S1B, C). Our experiments showed reduced Mac-3⁺-stained lesion area and absolute numbers of CD3⁺ T cells in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} compared to LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} mice. These data coincide with those observed in the ApoE^{-/-} p110 γ deletion model [20]. Flow cytometry results for basal circulating immune cell populations (before high-fat diet) in LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice were similar to those for p110 γ ^{+/-} and p110 γ ^{-/-} mice [40], except for neutrophils, which did not increase in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice. After high-fat diet treatment, LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} had more circulating monocytes than LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} mice (not shown), which suggests that reduced macrophage number in lesions is not a result of fewer circulating monocytes in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice.

Low Treg cell numbers in atherosclerotic lesions are reported in LDLR^{-/-} mice [41] and humans [42]. We observed few Foxp3⁺ cells in early lesions of LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice, which did not permit differentiation between genotypes. Because oxLDL downregulates Foxp3 expression in mouse effector cells *in vitro* [43], oxLDL

accumulation in lesions could explain the low Foxp3⁺ cell numbers. oxLDL in arterial walls might inhibit Treg cell function, contributing to chronicity [43]. Our data indicate that p110 γ does not affect Treg cell infiltration into atherosclerotic plaques.

Macrophage number in lesions is controlled by recruitment of circulating monocytes as well as by local proliferation [13], [14]. Our studies of aortic sections showed a lower percentage of proliferating macrophages in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} compared to LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} mice, although there were no differences in T cell proliferation between the two genotypes. We complemented *in vivo* analysis of macrophage proliferation with *in vitro* experiments using BMM. Whereas GM-CSF-induced proliferation was similar in BMM from p110 γ ^{+/-} and p110 γ ^{-/-} mice (Figure S2), we found reduced proliferation and a delay in S phase entry in M-CSF-stimulated LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} BMM compared with control LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} cells (Figure 2D), reflecting a specific role for p110 γ in these processes after M-CSF signaling.

A role for p110 γ is proposed for proliferation of T cells [30], [44], B cells [45], cancer cells from medulloblastoma [46] and hepatocellular carcinoma [47], although the underlying mechanisms remain largely unknown. In macrophages, M-CSF-mediated proliferation is inhibited when intracellular cAMP levels increase [48], leading to cell cycle arrest in G1 [49], [37]. Because p84/p87^{PIKAP}, the regulatory subunit of class I_B PI3K, is expressed at high levels in mouse macrophages, and the macromolecular complex p84/p110 γ /PDE3B regulates cAMP levels [35], [36], p110 γ might modulate cAMP levels in macrophages through formation of this complex. We propose that M-CSF induces macrophage proliferation through a mechanism that involves p84/p110 γ /PDE3B complex formation, leading to cAMP degradation (Figure 6A). In LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} macrophages, however, M-CSF did not reduce cAMP levels, since inefficient p84/p110 γ /PDE3B complex formation resulted in higher intracellular cAMP levels (Figure 6B). The higher cAMP levels in LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} than in LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} BMM (Figure 4A, B) correlated with proliferation rates, supporting this hypothesis.

Apoptosis was measured by TUNEL (Figure 3A) and cleaved caspase-3 (Figure 3B) immunofluorescent staining. Apoptosis was unaffected in LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} compared to LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mouse lesions (Figure 3), although there was a tendency toward less apoptosis in LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} lesions. This tendency might reflect a delay in lesion progression in LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mice, which have less advanced plaques than LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} mice after the same time on a high-fat diet. Apoptosis rates after the two-month diet were low in LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} and LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mice, possibly because lesions developed at this stage are still early lesions and apoptotic cells would be correctly efferocytosed, a process that worsens with lesion severity and leads to apoptotic cell accumulation [50]. We stained alpha smooth muscle actin (αSMA) to detect SMC in LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} and LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} aortic sections and found no differences in the percentage of αSMA⁺ staining relative to total lesion area in either genotype (Figure S3). As SMC are not reduced in LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} plaques, these cells might not have the proliferative defect found in LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} macrophages; this suggests that the proliferative disorder is cell type-specific.

Macrophages undergo classical activation in response to LPS and IFN_γ, as part of the Th1 response (M1), or alternative activation in response to IL-4 as part of the Th2 response (M2) [51]. Advanced lesions in old ApoE-null mice show a prevalence of M1 over M2 macrophages, suggesting that the M2 phenotype is atheroprotective [12]. In activated primary macrophages, expression of M2-related genes (*Arg-1*, *Il-10*, *Il13ra*, *Msr1*) depends on CREB-induced expression of *Cebpb* (a gene that encodes a protein important for macrophage antibacterial activity) [38]. High cAMP levels could thus be linked to M2 macrophage polarization. Our data from LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} and LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mice showed no significant differences in the relative number of M1 and M2 macrophages in atherosclerotic lesions, although there was a tendency toward increased percentages of M2 macrophages in LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} compared to LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} mice (Figure 5B). Likewise, *in vitro* macrophage polarization was unaffected when we compared p110^{γ+/-} and p110^{γ-/-} BMM, which showed similar M1 and M2 marker expression.

Our results suggest that in addition to affecting macrophage infiltration, p110_γ

deletion specifically alters *in situ* macrophage proliferation in atherosclerotic lesions. In M-CSF-stimulated macrophages, p110 γ might act downstream of the M-CSFR through a mechanism that reduces cAMP levels, promoting macrophage proliferation. In contrast, p110 γ has no role in M1/M2 macrophage differentiation or in apoptosis. Our findings confirm a mechanism by which atherosclerotic lesions can be reduced, and highlight p110 γ as a potential target for treatment of inflammatory diseases.

□Acknowledgements

We thank R. Mejías, J. Sánchez-Ruiz, A. Suárez-Fueyo, A. Franco and M. Tardáguila for primers, protocols and helpful suggestions, M.J. Andrés-Manzano for excellent technical assistance, S. Gutiérrez for help with image quantification, L. Almonacid for qRT-PCR studies, C.O. Sánchez for statistical advice and C. Mark for editorial assistance.

References

1. Hansson GK, Libby P (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6: 508-519.
2. Galkina E, Ley K (2009) Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 27: 165-197.
3. Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241.
4. Witztum JL, Palinski W (1999) Are immunological mechanisms relevant for the development of atherosclerosis? *Clin Immunol* 90: 153-156.
5. Weber C, Noels H (2011) Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 17: 1410-1422.
6. Moore KJ, Tabas I (2011) Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145: 341-355.
7. Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C (2008) Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1897-1908.
8. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964.
9. Falk LA, Vogel SN (1988) Comparison of bone marrow progenitors responsive to granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor-1. *J Leukoc Biol* 43: 148-157.
10. Hamilton JA (2008) Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8: 533-544.
11. Johnson JL, Newby AC (2009) Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol* 20: 370-378.

12. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, et al. (2010) Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 5: e8852.
13. Antonov AS, Munn DH, Kolodgie FD, Virmani R, Gerrity RG (1997) Aortic endothelial cells regulate proliferation of human monocytes in vitro via a mechanism synergistic with macrophage colony-stimulating factor. Convergence at the cyclin E/p27(Kip1) regulatory checkpoint. *J Clin Invest* 99: 2867-2876.
14. Sakai M, Kobori S, Miyazaki A, Horiuchi S (2000) Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11: 503-509.
15. Seimon T, Tabas I (2009) Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 Suppl: S382-387.
16. Biwa T, Sakai M, Shichiri M, Horiuchi S (2000) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plays an essential role in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Atheroscler Thromb* 7: 14-20.
17. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, et al. (1990) Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 344: 254-257.
18. Lamharzi N, Renard CB, Kramer F, Pennathur S, Heinecke JW, et al. (2004) Hyperlipidemia in concert with hyperglycemia stimulates the proliferation of macrophages in atherosclerotic lesions: potential role of glucose-oxidized LDL. *Diabetes* 53: 3217-3225.
19. Biwa T, Sakai M, Matsumura T, Kobori S, Kaneko K, et al. (2000) Sites of action of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase are distinct in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Biol Chem* 275: 5810-5816.
20. Chang JD, Sukhova GK, Libby P, Schwartz E, Lichtenstein AH, et al. (2007) Deletion of the phosphoinositide 3-kinase p110gamma gene attenuates murine atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8077-8082.

21. Varticovski L, Druker B, Morrison D, Cantley L, Roberts T (1989) The colony stimulating factor-1 receptor associates with and activates phosphatidylinositol-3 kinase. *Nature* 342: 699-702.
22. Kelley TW, Graham MM, Doseff AI, Pomerantz RW, Lau SM, et al. (1999) Macrophage colony-stimulating factor promotes cell survival through Akt/protein kinase B. *J Biol Chem* 274: 26393-26398.
23. Kanagasundaram V, Jaworowski A, Hamilton JA (1996) Association between phosphatidylinositol-3 kinase, Cbl and other tyrosine phosphorylated proteins in colony-stimulating factor-1-stimulated macrophages. *Biochem J* 320 (Pt 1): 69-77.
24. Saleem A, Kharbanda S, Yuan ZM, Kufe D (1995) Monocyte colony-stimulating factor stimulates binding of phosphatidylinositol 3-kinase to Grb2.Sos complexes in human monocytes. *J Biol Chem* 270: 10380-10383.
25. Munugalavadla V, Borneo J, Ingram DA, Kapur R (2005) p85alpha subunit of class IA PI-3 kinase is crucial for macrophage growth and migration. *Blood* 106: 103-109.
26. Yusoff P, Hamilton JA, Nolan RD, Phillips WA (1994) Haematopoietic colony stimulating factors CSF-1 and GM-CSF increase phosphatidylinositol 3-kinase activity in murine bone marrow-derived macrophages. *Growth Factors* 10: 181-192.
27. Vanhaesebroeck B, Jones GE, Allen WE, Zicha D, Hooshmand-Rad R, et al. (1999) Distinct PI(3)Ks mediate mitogenic signalling and cell migration in macrophages. *Nat Cell Biol* 1: 69-71.
28. Jones GE, Prigmore E, Calvez R, Hogan C, Dunn GA, et al. (2003) Requirement for PI 3-kinase gamma in macrophage migration to MCP-1 and CSF-1. *Exp Cell Res* 290: 120-131.
29. Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC (2005) Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* 30: 194-204.

30. Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, et al. (2000) Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 287: 1040-1046.
31. Barber DF, Bartolome A, Hernandez C, Flores JM, Fernandez-Arias C, et al. (2006) Class IB-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) deficiency ameliorates IA-PI3K-induced systemic lupus but not T cell invasion. *J Immunol* 176: 589-593.
32. Martin AL, Schwartz MD, Jameson SC, Shimizu Y (2008) Selective regulation of CD8 effector T cell migration by the p110 gamma isoform of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* 180: 2081-2088.
33. Fougerat A, Gayral S, Gourdy P, Schambourg A, Ruckle T, et al. (2008) Genetic and pharmacological targeting of phosphoinositide 3-kinase-gamma reduces atherosclerosis and favors plaque stability by modulating inflammatory processes. *Circulation* 117: 1310-1317.
34. Gobert Gosse S, Bourgin C, Liu WQ, Garbay C, Mouchiroud G (2005) M-CSF stimulated differentiation requires persistent MEK activity and MAPK phosphorylation independent of Grb2-Sos association and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell Signal* 17: 1352-1362.
35. Voigt P, Dorner MB, Schaefer M (2006) Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J Biol Chem* 281: 9977-9986.
36. Perino A, Ghigo A, Ferrero E, Morello F, Santulli G, et al. (2011) Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110gamma. *Mol Cell* 42: 84-95.
37. Xaus J, Valledor AF, Cardo M, Marques L, Beleta J, et al. (1999) Adenosine inhibits macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation of macrophages through the induction of p27kip-1 expression. *J Immunol* 163: 4140-4149.

38. Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, et al. (2009) A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17475-17480.
39. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, et al. (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92: 883-893.
40. Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, et al. (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287: 1049-1053.
41. Gotsman I, Grabie N, Gupta R, Dacosta R, MacConmara M, et al. (2006) Impaired regulatory T-cell response and enhanced atherosclerosis in the absence of inducible costimulatory molecule. *Circulation* 114: 2047-2055.
42. de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, van der Wal AC (2007) Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions. *PLoS One* 2: e779.
43. Mor A, Planer D, Luboshits G, Afek A, Metzger S, et al. (2007) Role of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 893-900.
44. Alcazar I, Marques M, Kumar A, Hirsch E, Wymann M, et al. (2007) Phosphoinositide 3-kinase gamma participates in T cell receptor-induced T cell activation. *J Exp Med* 204: 2977-2987.
45. Beer-Hammer S, Zebedin E, von Holleben M, Alferink J, Reis B, et al. (2010) The catalytic PI3K isoforms p110gamma and p110delta contribute to B cell development and maintenance, transformation, and proliferation. *J Leukoc Biol* 87: 1083-1095.
46. Guerreiro AS, Fattet S, Kulesza DW, Atamer A, Elsing AN, et al. (2011) A sensitized

RNA interference screen identifies a novel role for the PI3K p110gamma isoform in medulloblastoma cell proliferation and chemoresistance. *Mol Cancer Res* 9: 925-935.

47. Dituri F, Mazzocca A, Giannelli G, Antonaci S (2011) PI3K functions in cancer progression, anticancer immunity and immune evasion by tumors. *Clin Dev Immunol* 2011: 947858.

48. Rock CO, Cleveland JL, Jackowski S (1992) Macrophage growth arrest by cyclic AMP defines a distinct checkpoint in the mid-G1 stage of the cell cycle and overrides constitutive c-myc expression. *Mol Cell Biol* 12: 2351-2358.

49. Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CJ (1994) Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79: 487-496.

50. Tabas I (2005) Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2255-2264.

51. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.

Figure legends

Figure 1. Macrophage and T cell infiltration decrease in lesions of LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} compared to LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} mice. Aortic sinus sections were studied in LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} (females, *n* = 6) and LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} mice (females, *n* = 7) after two months on a high-fat diet. (A) Representative photomicrographs of Mac-3⁺ cells in aortic sections after immunohistochemical staining. Bar = 200 μm. Arrows indicate Mac-3⁺ area. (B) Quantitative analysis of Mac-3⁺ area per aortic sinus section. Mean ± SD; Student's *t*-test, *p*<0.05. (C) Absolute numbers of CD3⁺ cells per aortic sinus section of indicated mice, quantitated using ImageJ software. Mean ± SD; Poisson test, *p*<0.01.

Figure 2. Macrophage proliferation in aortic plaque is impaired in LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} mice whereas T cell proliferation is unaffected. Atherosclerotic plaques were studied in LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} (female, *n* = 5) and LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} (female, *n* = 6) mice after two months on a high-fat diet. (A) Representative photomicrographs of immunofluorescent staining for macrophage proliferation in aortic sections. Bar = 30 μm. (B) Percentage of proliferating relative to total macrophages in lesion area. (C) Immunofluorescent-stained atherosclerotic plaques. Percentage of proliferating T cells relative to total T cells in lesion area, quantified with ImageJ. (D) Percentage of bone marrow-derived macrophages (BMM) in G2/M, S and G0/G1 phases at 26 h post-M-CSF stimulation in LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} mice (*n* = 3 experiments, each with a pool of 3 mice/genotype). Mean ± SD; Student's *t*-test, *p*<0.05 (for B, D).

Figure 3. Lesion macrophage apoptosis is unaffected by p110^γ deletion. Atherosclerotic plaques were analyzed in LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} mice after a two-month high-fat diet. (A) Representative photomicrographs of TUNEL immunofluorescent staining for lesion apoptosis in aortic sections from LDLR^{-/-}p110^γ^{+/-} (*n* = 3) and LDLR^{-/-}p110^γ^{-/-} mice (*n* = 5) (top); percentage of TUNEL⁺ relative to total cells in the delimited lesion area (bottom). Bar = 50 μm. (B) Representative photomicrographs of cleaved caspase-3 immunofluorescent staining for lesion apoptosis in aortic sections

from LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} (*n* = 4) and LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mice (*n* = 5) (top); percentage of cleaved caspase-3⁺ relative to total cells in the delimited lesion area (bottom). Bar = 50 μm. Mean ± SD; Student's *t*-test.

Figure 4. Intracellular cAMP levels are higher in LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} than in LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} macrophages. BMM were allowed to differentiate and were lysed. (A) Western blot of LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} and LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} BMM extracts to detect cAMP expression after M-CSF stimulation (0, 24 and 48 h). (B) Gel bands were quantified with ImageJ as the total amount of cAMP (measured in millios of AU). Mean of three independent experiments, each with 1 mouse/genotype.

Figure 5. M1 and M2 macrophage populations are similar in LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} and LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mice. (A) Representative photomicrographs of immunofluorescent-stained M1 (iNOS⁺) and M2 (arginase1⁺) macrophages in aortic sinus sections from LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} and LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mice fed a two-month high-fat diet (*n* = 5/genotype). Bar = 50 μm. (B) Quantification of the percentage of M1⁺ (iNOS⁺), M2⁺ (arginase1⁺) and M1⁺M2⁺ (iNOS⁺arginase1⁺) macrophage subsets relative to total macrophages in aortic plaques. Mean ± SD; Student's *t*-test. Expression of M1 (iNOS, IL-12) and M2 markers (arginase1, YM1, IL-10) was analyzed by qRT-PCR in BMM stimulated with (C) IFN_γ + LPS (M1) (*n* = 3 experiments, each with a pool of 2-3 mice/genotype) or (D) IL-4 (M2) (*n* = 2 experiments, each with a pool of 2-3 mice/genotype); mean log 2^{-ΔΔCt} for each genotype is shown. RQ = 2^{-ΔΔCt}.

Figure 6. Scheme of the proposed mechanism for macrophage proliferation in LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} and LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mice. (A) Mechanism proposed for LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} mice. (B) Mechanism proposed for LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mice.

□ **Table 1. Foxp3⁺ cell infiltrates in atherosclerotic lesions from LDLR^{-/-}p110^{γ+/-} and LDLR^{-/-}p110^{γ-/-} mice**

n° Foxp3⁺ cells/section	LDLR^{-/-} p110γ^{+/-}	LDLR^{-/-} p110γ^{-/-}
(n = 3 sections/mouse)	(mean \pm SD)	(mean \pm SD)
Mouse 1	0 \pm 0	0 \pm 0
Mouse 2	0.667 \pm 0.578	0 \pm 0
Mouse 3	0.333 \pm 0.578	0 \pm 0
Mouse 4	0 \pm 0	0 \pm 0
Mouse 5	0 \pm 0	0 \pm 0
Mouse 6	0.333 \pm 0.578	0 \pm 0
Mouse 7	2.667 \pm 0.578	0 \pm 0
Mouse 8	0.667 \pm 0.578	0 \pm 0
Total all mice	0.583 \pm 0.886	0 \pm 0

Quantitative analysis of Foxp3⁺ cells per aortic sinus section of indicated mice ($n = 8$ /genotype). Results show mean \pm SD.

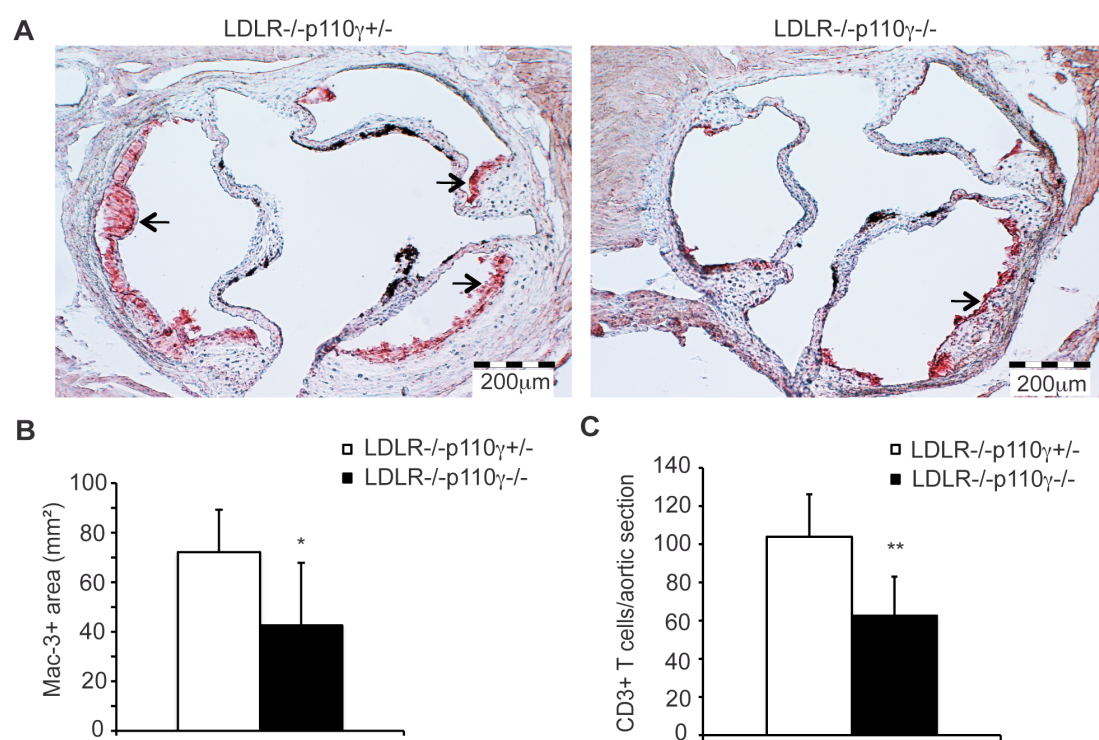


Figure 1

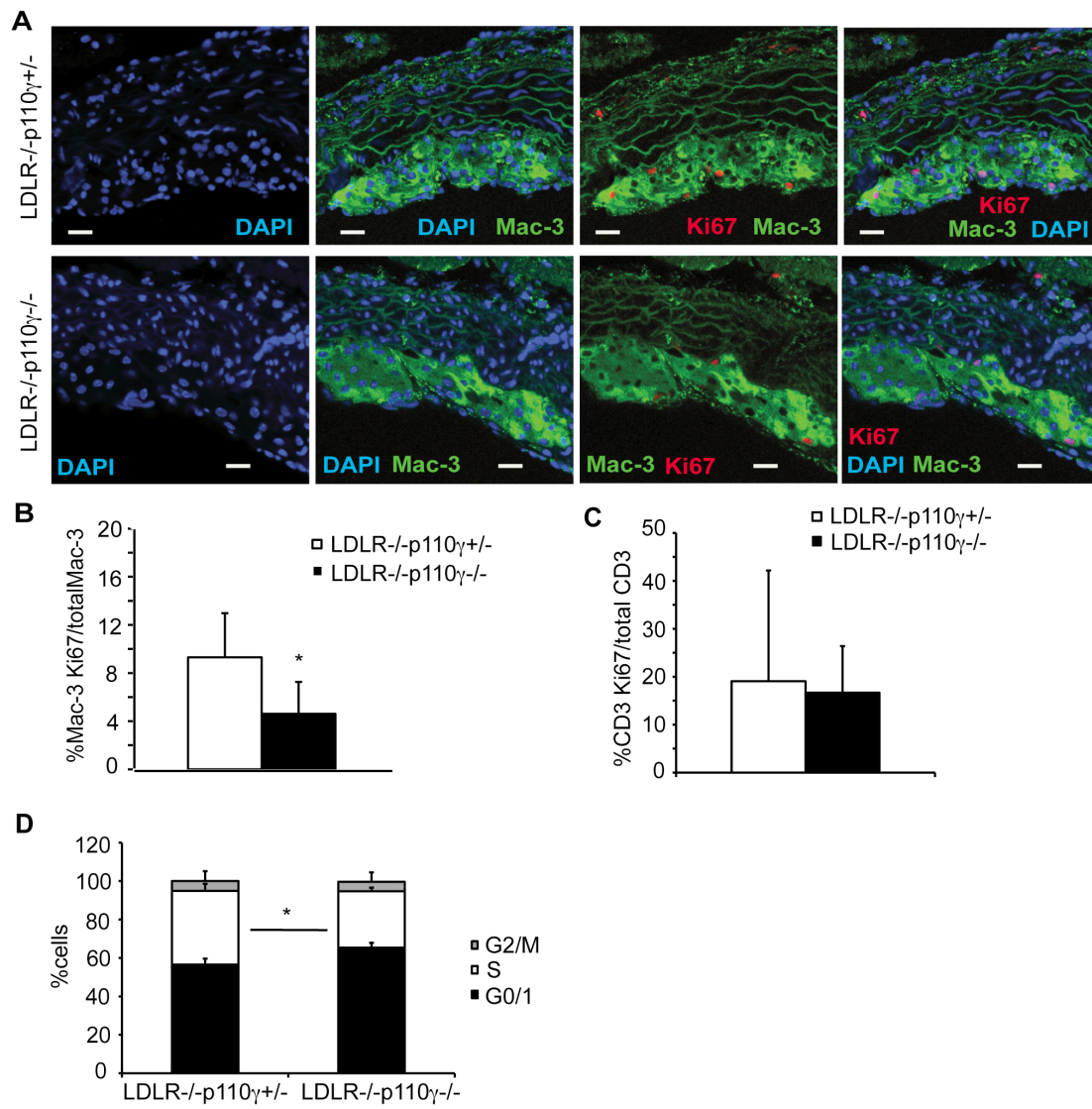


Figure 2

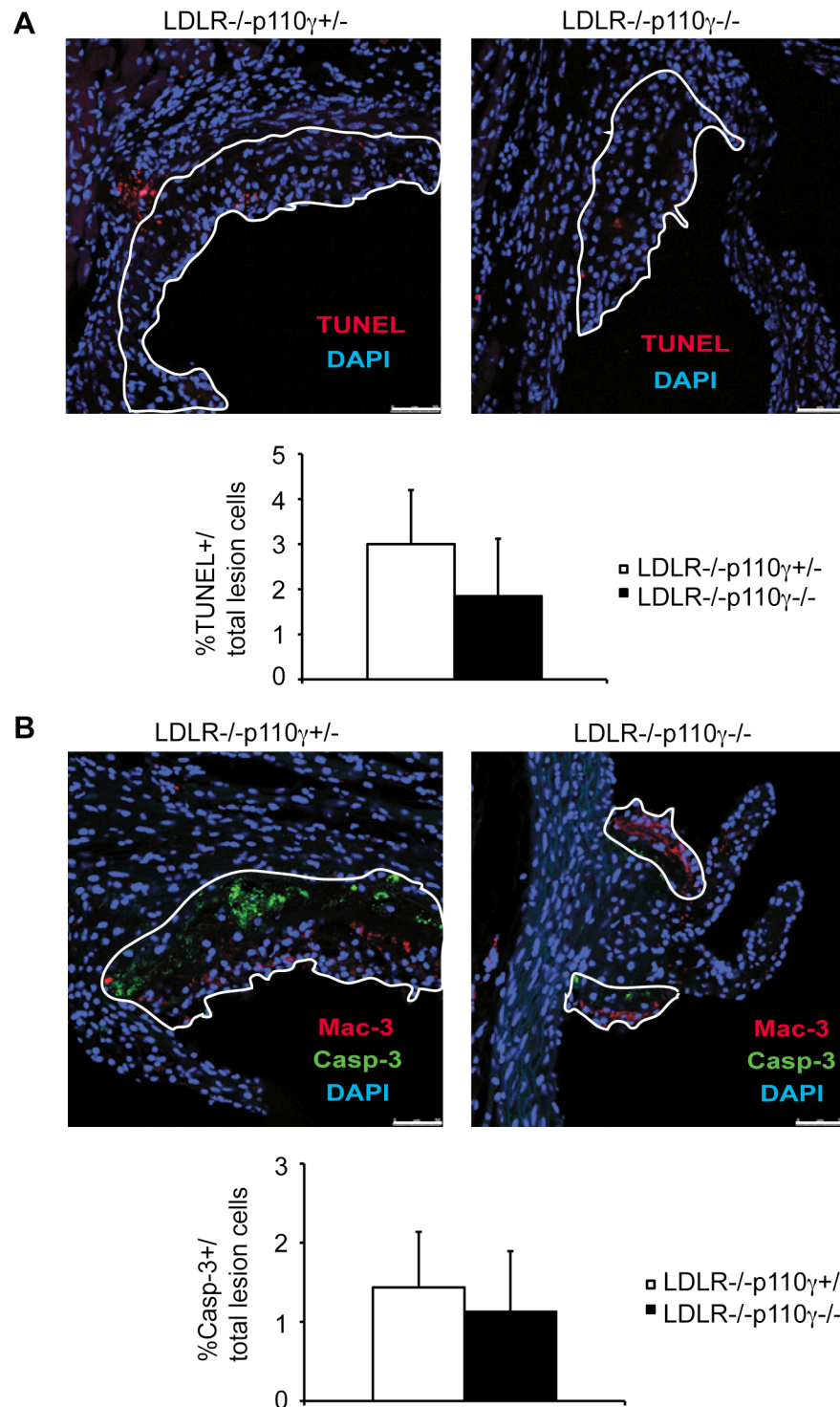


Figure 3

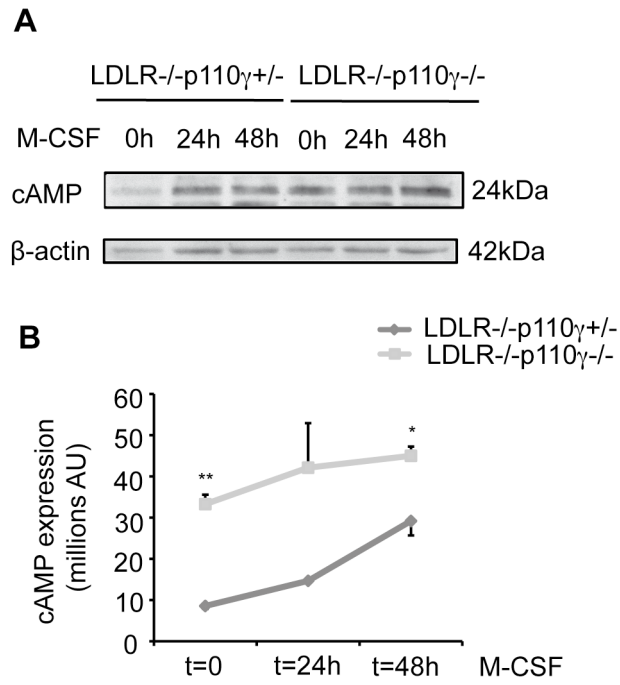


Figure 4

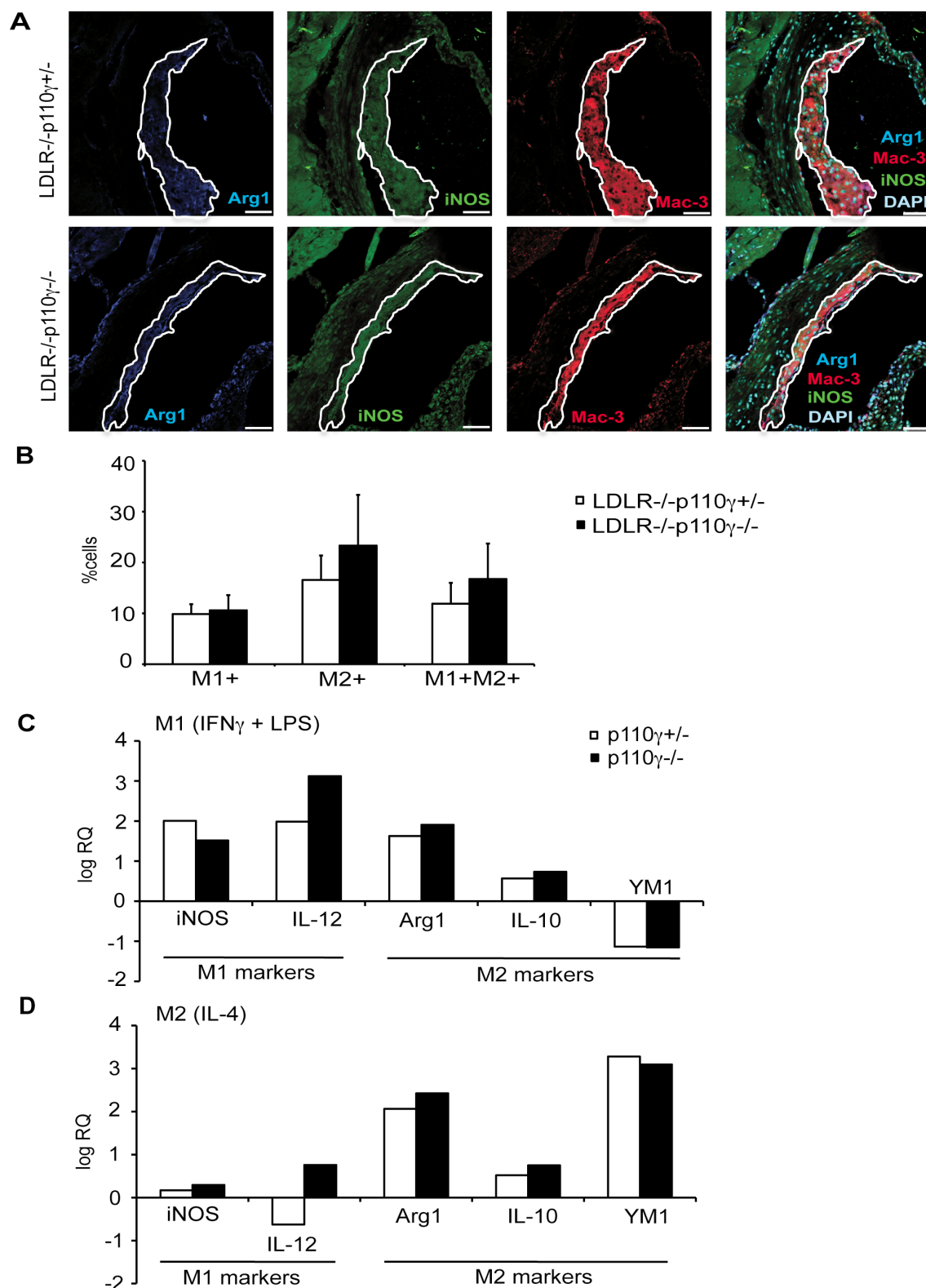


Figure 5

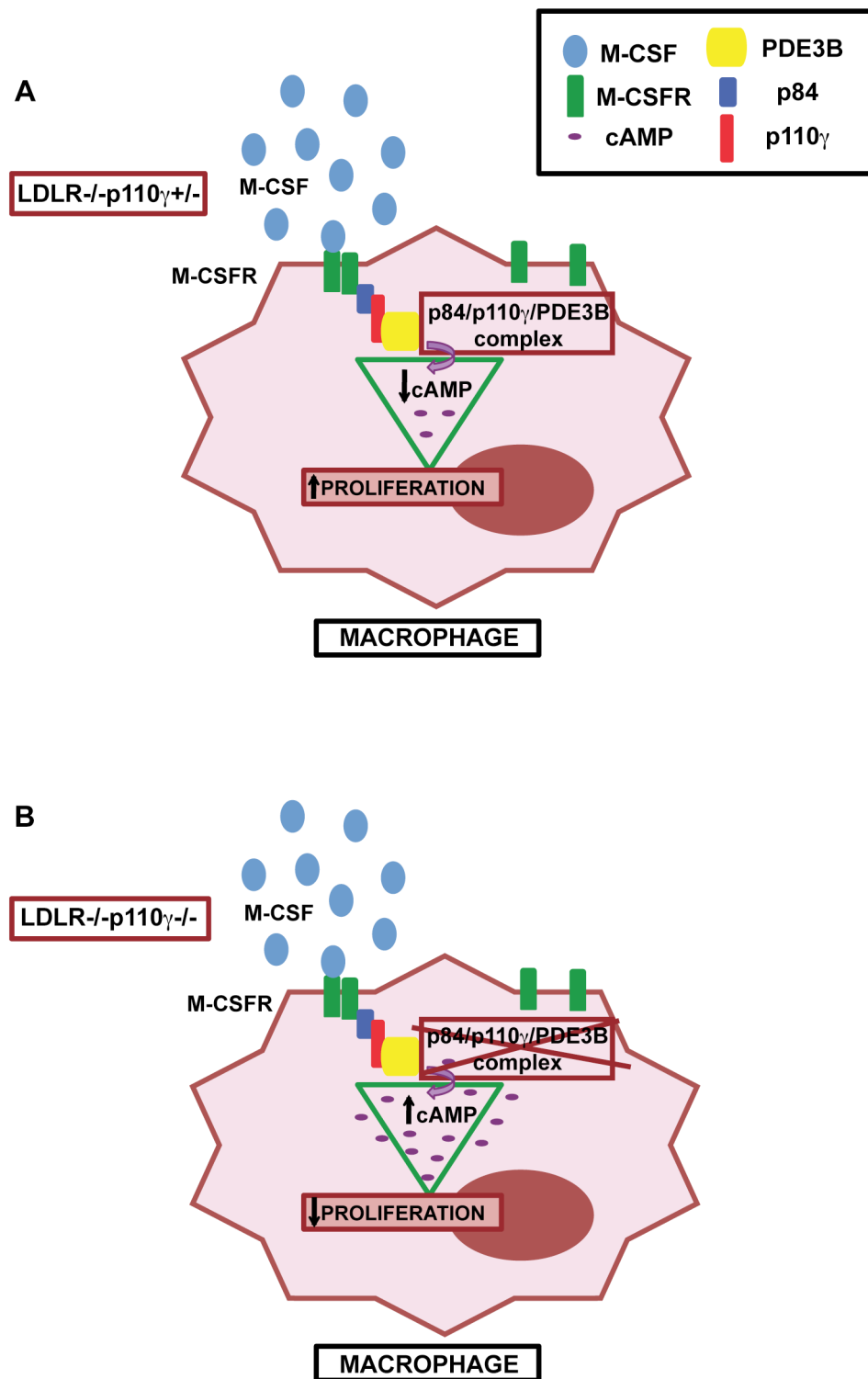


Figure 6

SUPPORTING INFORMATION

Supporting materials and methods

Analysis of serum lipid levels

To analyze serum lipid levels, we anesthetized mice by intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (121 mg/kg) and xylazine (14 mg/kg); tail- and toe-pinch reflexes were tested to monitor adequacy of anesthesia. Whole blood was then extracted by retro-orbital bleeding before ($t = 0$) and after ($t = 2$ months) high-fat diet treatment, allowed to coagulate (room temperature [RT], 3 to 5 h) and centrifuged to collect serum, which was frozen (-20°C). Samples were sent to an external laboratory (Labipath, Madrid, Spain) for analysis of lipid levels (total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides).

Lesion area quantification

Paraffin-embedded sections of the aortic valve region of $\text{LDLR}^{-/-}\text{p110}\gamma^{+/-}$ and $\text{LDLR}^{-/-}\text{p110}\gamma^{-/-}$ mice were hematoxylin-eosin stained. Serial sections were dewaxed in xylene and rehydrated in ethanol, incubated in Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 15 min) and washed in water (10 min). Sections were incubated in eosin (2 to 4 min), washed twice in 70% ethanol, dehydrated with 100% ethanol and xylene, mounted in Entellan (Merck, Madrid, Spain) and dried at 37°C . Aortic lesion area was quantified with ImageJ software.

Immunohistochemical detection of CD3^{+} T cells, Mac-3^{+} macrophages and Foxp3^{+} regulatory T cells

Hearts from $\text{LDLR}^{-/-}\text{p110}\gamma^{+/-}$ and $\text{LDLR}^{-/-}\text{p110}\gamma^{-/-}$ mice were fixed and paraffin-embedded. Serial sections were dewaxed and rehydrated as above. Antigens were exposed by steaming in sodium citrate buffer (15 min). Samples were blocked with peroxidase (Peroxidase Block, Dako, Glostrup, Denmark) and incubated (RT, 1 h) with the following primary antibodies: monoclonal rat anti-mouse Lamp-2 (Mac-3) (M3/84; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), rat anti-mouse Foxp3-FITC (eBioscience, San Diego, CA) and rabbit anti-human CD3 (Dako). After several washes in 0.3% TBS-Triton, tissue was incubated

with EnVision System-HRP (AEC) anti-rabbit for mouse tissues (Dako) and Simple Stain Rat MAX PO anti-rat for mouse tissues (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) (RT, 1 h). The signal was developed with AEC (3-amino 9-ethylcarbazole) Substrate Chromogen (Dako; 15 min). Samples were hematoxylin counterstained and sections mounted in aqueous medium (Fluoromount-G, Southern Biotech, Birmingham, AL). Images were acquired using a Leica microscope (vertical Leitz DM RB) with an adapted Olympus (DP70) camera.

***In vivo* determination of macrophage and T cell proliferation**

Slides were incubated (65°C, 30 min) to improve section adhesion before dewaxing and rehydration. Antigens were exposed in sodium citrate buffer. Pap Pen (Research Products International, Mount Prospect, IL) was used to delimit sections. Samples were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma) in PBS (RT, 45 min). Primary antibodies (rat anti-mouse Ki67 and rabbit anti-human CD3 [both from Dako], rat anti-mouse Lamp-2 [Santa Cruz], rabbit anti-mouse Ki67 [Master Diagnostica, Granada, Spain]) were diluted in blocking solution. After several washes in PBS, samples were incubated (RT, 45 min in a humidified chamber) with appropriate secondary antibody (Alexa647- or Alexa546-goat anti-rat or Alexa488-goat anti-rabbit [Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA]) diluted in blocking solution. Nuclei were DAPI-stained (15 min), washed in PBS, and slides mounted in Fluoromount-G (Southern Biotech) or Slow Fade Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Grand Island, NY). Images were acquired in a Zeiss LSM-510 META ConfoCor2 microscope and analyzed using LSM-FCS software and ImageJ.

***In vivo* study of M1 and M2 macrophages**

M1 and M2 macrophages were analyzed by immunofluorescent staining of the aortic valve region in paraffin-embedded sections as for T cell and macrophage proliferation, but included incubation with purified anti-mouse IgG1 κ antibody (eBioscience) prior to blocking. Primary antibodies were rabbit anti-mouse iNOS (Upstate/Millipore, Billerica, MA), mouse anti-mouse arginase1 (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ)

and rat anti-mouse Lamp-2. Secondary antibodies were Alexa546-goat anti-rat, Alexa488-goat anti-rabbit, or Cy5-goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluted in blocking solution. Quantification was performed with ImageJ.

***In vivo* determination of lesion apoptosis and smooth muscle cells**

Slides were incubated (65°C, 30 min) to improve section adhesion before dewaxing and rehydration. Antigens were exposed in sodium citrate buffer. Pap Pen was used to delimit sections. Samples were blocked with 3% goat serum in PBS 0.25% Triton X-100 (RT, 45 min). Primary antibodies (anti-alpha smooth muscle actin (Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-mouse cleaved caspase-3 (Cell Signaling, Danvers, MA) and rat anti-mouse Lamp-2 (Santa Cruz)) were diluted in blocking solution and incubated (4°C, overnight). After several washes in PBS, samples were incubated (RT, 45 min in a humidified chamber) with appropriate secondary antibody (Alexa546-goat anti-rat or Alexa488-goat anti-rabbit [Molecular Probes/Invitrogen]) diluted in blocking solution. Nuclei were DAPI-stained (15 min), washed in PBS, and slides mounted in Fluoromount-G (Southern Biotech). Images were acquired in a Leica SP5 microscope and analyzed with ImageJ.

For TUNEL staining, slides were incubated (65°C, 30 min) to improve section adhesion before dewaxing and rehydration, then washed several times with distilled water or PBS and permeabilized (PBS 0.5% Triton X-100, RT, 10 min). Slides were pre-incubated (RT, 15 min) with TdT1X buffer + 1 mM CoCl₂ (TdT1X buffer: 125 mM Tris-HCl, 1.25 mg/ml BSA, 1 M sodium cacodylate (last two from Sigma), pH 6.6), in the dark in humidified chambers (as for all further incubations). Slides were incubated with reaction mix (recombinant terminal transferase and biotin-16-dUTP (both from Roche) diluted in TdT1X buffer + 1 mM CoCl₂ (37°C, 1 h), then washed with TdT1X buffer + 1 mM CoCl₂ (RT, 10 min). The reaction was terminated with PBS + 0.01% Tween20, slides were washed, and incubated with streptavidin-Cy5 (Jackson) (RT, 1 h). Nuclei were DAPI-stained (RT, 15 min) and mounted with Fluoromount-G. Images were taken with a Leica SP5 confocal microscope and analyzed with Image J.

Macrophage isolation and culture

Mice were euthanized with CO₂. Bone marrow-derived macrophages (BMM) were obtained from femoral bone marrow suspensions and allowed to differentiate for 7 days in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with antibiotics, 20% fetal bovine serum (FBS) and 3 ng/ml recombinant M-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ).

Macrophage cell cycle analysis

BMM were synchronized in G0/G1 by 18-36 h of M-CSF deprivation (DMEM, 10% FBS, 0.5% L929-cell-conditioned medium) and then stimulated for different times with DMEM, 10% FBS, 10% L929-cell-conditioned medium as a source of M-CSF or with DMEM, 10% FBS and 10 ng/ml GM-CSF (Peprotech). Macrophages were trypsinized and collected. After fixing in 80% ethanol (-20°C, 1 h), cells were incubated at least 30 min with 50 µg/ml propidium iodide (P4170, Sigma) containing 0.25 mg/ml RNase A (R4642, Sigma). Labeled cells were analyzed in a FACSCanto flow cytometer (Becton Dickinson) and DNA histograms were fitted to cell cycle distributions using MultiCycle AV software (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

qRT-PCR analysis of M1 and M2 macrophage marker expression

RNA was extracted with TRI Reagent (Sigma) from *in vitro*-polarized M1 and M2 macrophages from p110 $\gamma^{+/-}$ and p110 $\gamma^{-/-}$ mice. cDNA was obtained from 1 µg total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 496 thermocycler (MWG AG Biotech, Ebersberg, Germany). Several dilutions of each cDNA were used as templates for PCR amplification. Oligonucleotide primers used were iNOS, IL-12, arginase1, IL-10 and YM1. For iNOS, forward primer 5'-GCTGTGCTCCATAGTTTCCAG-3' and reverse primer 5'-GGACCAGCCAAATCCAGTC-3'; for IL-12, forward primer 5'-TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG-3' and reverse primer 5'-ACAGGTGAGGTTC ACTGTTTCT-3'; for arginase 1, forward primer 5'-TCCAAGCCAAAGTCCTT AGAG-3' and reverse primer 5'-AGGAGCTGTCATTAGGGACATC-3'; for IL-10,

forward primer 5'-AGGCGCTGTCATCGATTCTC-3' and reverse primer 5'-TGGCCTGTAGACACCTTGGTC-3'; for YM1, forward primer 5'-ACTTTGATGGCCTCAACCTG-3' and reverse primer 5'-AATGATTCCTGCTCCTGTGG-3'. Amplification was performed at 95°C, 10 min; 40 cycles, 95°C, 15 sec; 60°C, 20 sec; 72°C, 30 sec. To confirm amplification purity, a dissociation curve was generated at 95°C, 15 sec; 60°C, 15 sec and 2% ramp to 95°C. For p110 $\gamma^{+/-}$, mRNA levels were normalized to a non-differentiated p110 $\gamma^{+/-}$ control and for p110 $\gamma^{-/-}$, to a non-differentiated p110 $\gamma^{-/-}$ control, using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method for relative quantification of real-time quantitative PCR data. This method relates the PCR signal from the target sample to that of a control sample. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (RQ) represents the amount of target, normalized to an endogenous reference and relative to a calibrator. Results were analyzed using SDS v2.2.2.

□ Supporting results

Analysis of serum lipid levels and lesion area quantification

Serum levels of total, HDL- and LDL-cholesterol, and triglycerides were measured pre- and post-diet. High-fat diet increased serum cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides similarly in LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{+/-}$ and LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{-/-}$ mice at all times tested (Figure S1A). We analyzed atherosclerosis burden by planimetric analysis of hematoxylin/eosin-stained cross-sections of the aortic sinus (Figure S1B). Lesion size (mm²) was smaller in LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{-/-}$ than in LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{+/-}$ mice (Figure S1C).

Supporting figure legends

Figure S1. Mice lacking LDLR and PI3K p110 γ show smaller atherosclerotic lesions than controls. Lesion progression was studied in LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{+/-}$ and LDLR $^{-/-}$ p110 $\gamma^{-/-}$ mice before (t = 0) and after (t = 2 months) high-fat diet treatment. **(A)** Total serum cholesterol, HDL- and LDL-cholesterol and triglycerides were measured. t = 0, n = 10 mice/genotype; t = 2 months, n = 4 mice/genotype. Student's *t*-test, p < 0.05 **(B)** Representative

photomicrographs of hematoxylin/eosin-stained aortic sinus sections from LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} female mice. Lesion area is delimited. Bar = 200 μ m. (C) Quantitative analysis of lesion size in the aortic sinus of LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} ($n = 6$) and LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice ($n = 5$) using ImageJ. Student's t -test, $p < 0.05$

Figure S2. Proliferation of GM-CSF-stimulated macrophages is unaffected by p110 γ deficiency. Percentage of BMM in cell cycle S phase at various times post-GM-CSF stimulation in p110 γ ^{+/-} and p110 γ ^{-/-} BMM ($n = 2$ experiments, each with a pool of 3 mice/genotype).

Figure S3. Smooth muscle actin expression in lesions is unaffected by p110 γ deletion. Atherosclerotic lesions were studied in LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice after a two-month high-fat diet treatment. SMA was immunofluorescence-stained in aortic sinus sections from LDLR^{-/-}p110 γ ^{+/-} and LDLR^{-/-}p110 γ ^{-/-} mice. The percentage is shown of SMA⁺-stained area relative to total lesion area.

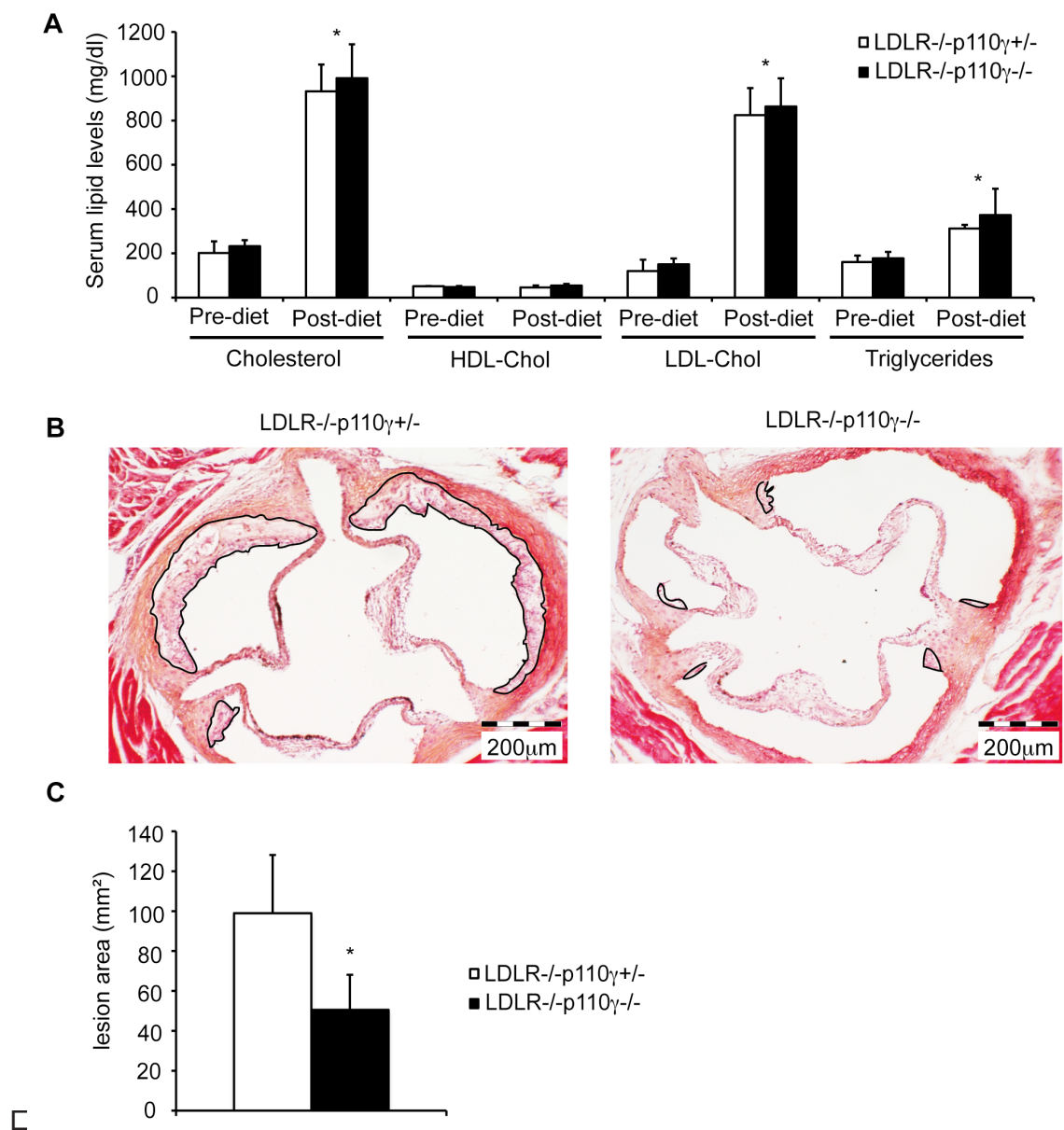


Figure S1

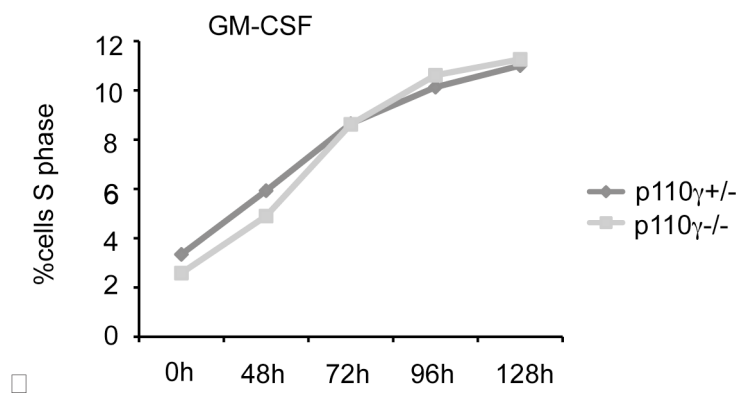


Figure S2

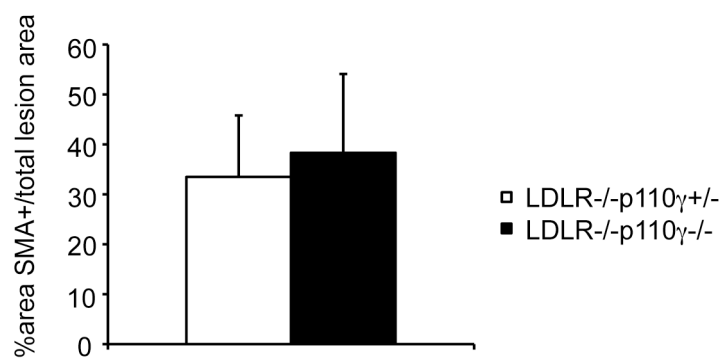


Figure S3

PI3K p110 δ is expressed in gp38⁺ stromal cells from secondary lymphoid organs and contributes to stromal cell distribution

Teresa M. Zotes¹, Sonia Pérez-Yagüe¹, Carlos O. Sorzano², Klaus Okkenhaug³, Bart Vanhaesebroeck⁴, Ana C. Carrera¹ and Domingo F. Barber^{1,*}

¹Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotechnología (CNB-CSIC), Darwin 3, Campus de Cantoblanco 28049, Madrid, Spain

²Biocomputing Unit, Centro Nacional de Biotechnología (CNB-CSIC), Darwin 3, Campus de Cantoblanco 28049, Madrid, Spain

³Laboratory of Lymphocyte Signalling and Development, Babraham Institute, Cambridge CB22 3AT, UK

⁴Centre for Cell Signaling, Institute of Cancer, Queen Mary University of London, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, UK

*Corresponding author: Darwin 3; Campus de Cantoblanco; 28049 Madrid, Spain

Tel: +34 91/5855307; Fax: +34 91/3720493; E-mail: dfbarber@cnb.csic.es

Abstract

Stromal cell function and distribution in secondary lymphoid organs participate in immune response generation. The role of PI3K p110 δ in lymphoid cells has been studied extensively, showing its importance in immune cell differentiation, activation and development. Severe structural anomalies in p110 δ -deficient mouse secondary lymphoid organs suggest that this isoform contributes to the formation and maintenance of these organs. To determine whether lack of p110 δ activity affects the immune response not only through its role in lymphoid cells but also in stromal cells, we performed bone marrow reconstitution assays using mice with catalytically inactive p110 δ (p110 $\delta^{\text{D910A/D910A}}$). After reconstituting the bone marrow compartment of lethally irradiated p110 $\delta^{\text{WT/WT}}$ or p110 $\delta^{\text{D910A/D910A}}$ recipient mice with p110 $\delta^{\text{WT/WT}}$ or p110 $\delta^{\text{D910A/D910A}}$ mouse bone marrow, we studied the distribution of cell subsets and total lymphoid cell number in homeostatic conditions and after antigen stimulation. In addition, we tested whether p110 δ regulates the distribution and texture of secondary lymphoid organ stromal cell populations and whether it is expressed in these stromal cells. The structure of spleens from p110 $\delta^{\text{WT/WT}}$ recipient mice reconstituted with p110 $\delta^{\text{WT/WT}}$ or p110 $\delta^{\text{D910A/D910A}}$ bone marrow was similar to that of p110 $\delta^{\text{WT/WT}}$ mouse spleens (organized), whereas spleens of p110 $\delta^{\text{D910A/D910A}}$ mice reconstituted with p110 $\delta^{\text{WT/WT}}$ or p110 $\delta^{\text{D910A/D910A}}$ bone marrow resembled those of p110 $\delta^{\text{D910A/D910A}}$ mice (disorganized structure), suggesting a p110 δ function in secondary lymphoid organ stroma. Lack of p110 δ led to severe disruption of T cell zone stromal cell distribution and secondary lymphoid organ integrity, which was most pronounced in spleen. We also report p110 δ expression in spleen and lymph node gp38⁺ stromal cell populations.

Introduction

Lymphoid stromal cells maintain the microarchitectural organization of secondary lymphoid organs (SLO). This organization facilitates effective communication between antigen-presenting cells (APC) and T lymphocytes, necessary for a protective immune response to pathogens. Infection by certain pathogens such as human and simian immunodeficiency viruses, lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) or *Leishmania donovani* can lead to immunodeficiency by disrupting SLO microanatomy and thus, integrity (reviewed in [1]). In the case of LCMV, antiviral cytotoxic T cells destroy infected fibroblastic reticular cells (FRC), characteristic T cell zone stromal cells, rendering the host unable to respond to secondary infection [2].

Spleen and lymph node (LN) stromal cells, such as FRC and follicular dendritic cells (FDC), secrete cytokines and chemokines and express adhesion molecules that contribute to immune cell migration, homeostasis and survival [3], [4], [5]. Stromal cells also participate in antigen presentation, as APC adhere to the stromal network and lymphocytes crawl along the surface of this network to encounter antigen [1], [5]. After T cell-APC (dendritic cell (DC)) coupling, FRC produce inducible nitric oxide synthase (iNOS). This stromal iNOS adjusts local immune response by limiting T cell clustering, proliferation and cell cycle progression [6]; FRC thus modulate T cell responses. In addition to FRC, lymphatic endothelial cells (LEC) from LN limit T cell proliferation by expressing the nitric oxide synthase 2 gene (*NOS2*) and producing NO after interaction with activated T cells [7], [8]. Stromal cells thus have both positive and negative activity in the generation of T cell-mediated immune responses, creating a feedback loop that could help to maintain SLO structure and function in homeostasis and in inflammation [9]. There is nonetheless much to learn regarding the precise role of stromal cells in physiological immune responses and in autoimmunity.

The formation of SLO microarchitecture implicates B/T cell segregation, which depends on chemokines secreted by non-hematopoietic stromal cells. In homeostasis, primary B

cell follicles contain FDC, which participate in B cell compartment organization and in antigen presentation to B cells. The FDC recruit B cells by secreting CXCL13, which binds to B cell CXCR5 [10]. The FRC stromal cell subset forms a network that structures the T cell area [11]; FRC secrete CCL19 and CCL21, chemokines that attract CCR7-expressing T cells and DC to facilitate antigen encounter [3], [12], [13]. FRC constitute the conduit system that allows small antigens and chemokines to migrate to SLO B and T cell areas. Large antigens are excluded from this conduit and are trapped by APC in the spleen marginal zone or in the LN subcapsular sinus. The conduit system extends mainly through the T cell area and also reaches B cell follicles, although less dense. In LN, naïve lymphocytes extravasate from the bloodstream through high endothelial venules (HEV) (vasculature shared by the circulatory and the lymphatic systems). HEV are surrounded by B and T cell areas, and open into the cortical zone of LN [1]. In contrast, antigens and APC enter LN through afferent lymphatic vessels that terminate in the LN subcapsular sinus [1].

The spleen filters damaged erythrocytes from the blood, and allows surveillance of blood-borne pathogens and large antigens [15]. The spleen is divided into two well-defined areas, the red pulp and the white pulp (which has higher immunological activity). White pulp structure resembles that of LN, with segregated B and T cell areas and a conduit system [15]. The marginal zone (MZ) separates the red and white pulp and contains mainly phagocytic macrophages (marginal metallophilic macrophages (MMM) and marginal zone macrophages (MZM)), marginal zone B cells (MZB) and DC [15].

Embryonic organogenesis of SLO depends on interaction between two main cell types, lymphoid tissue inducer cells (LTi) and lymphoid tissue organizer cells (LTo); the latter are mesenchymal stromal cells [16], [17], [18]. In adults, lymphoid tissue generation requires spleen LTi cells, which maintain B/T segregation by expressing $LT\alpha$, $LT\beta$ and $TNF\alpha$, needed to control SLO structure in adulthood [19]. Adult LTi differ from neonatal LTi in their increased expression of the $CD4^+$ T cell survival factors OX40L and CD30L, also necessary for memory T cell generation [19], [20], [21]. Marginal reticular cells (MRC), the LTo counterpart in adults [22], are located beneath the subcapsular sinus in LN

or in the MZ in spleen, adjacent to B cell follicles [23].

p110 δ is a catalytic subunit of class I_A PI3K, together with p110 α and p110 β . It shares a catalytic domain with the other PI3K and binds to a regulatory subunit (p85 α or β , p55 α , p50 α or p50 γ). p110 δ is expressed preferentially in leukocytes, whereas p110 α and p110 β are ubiquitous [24]; p110 δ is also expressed in neurons [25], in some cancer cell lines [26], [27], and in endothelial cell lines [27], [28]. p110 δ has a central role in immune cell processes, including differentiation, activation and development of B and T cells [29], [30], [31], [32], [33] regulatory T cells [34], macrophages [35] and mast cells [36]. p110 δ is also essential for generation of immune responses, both primary and secondary (memory) [31], [32], [33], [37], [38]. Activation of PI3K promotes proliferation, migration, differentiation or survival of several immune cell types, and its suppression can attenuate immune responses or enhance inflammation. Nonetheless, there are no reports of p110 δ expression in SLO gp38⁺ stromal cells. We found p110 δ expression by SLO stromal cells, which are involved in immune response generation and in establishing immunocompetence; this suggests an unreported function for PI3K p110 δ in the immune response.

Methods

Mice

p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice [30] were bred and maintained in specific pathogen-free conditions in our animal facility; the CNB Ethics Committee for Animal Experimentation approved all animal studies (refs 12021, 12022), in compliance with national and European Union legislation. All efforts were made to minimize suffering.

Bone marrow reconstitution assays

p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice were lethally γ -irradiated (single dose, 10 Gy). After 3–4 h, mice were reconstituted by intravenous injection (tail vein) of total bone marrow from p110 $\delta^{WT/WT}$ or p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice. Six weeks after reconstitution, mice were sacrificed, and spleen and LN collected. Half were frozen for immunofluorescence studies, and the remainder used to prepare single-cell suspensions for populations counts and flow cytometry analysis.

Hematoxylin-eosin staining of spleen sections

Frozen spleen sections from unreconstituted and reconstituted p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice were hematoxylin/eosin stained to analyze lymphoid follicle area (see Supporting Information online).

Immunofluorescence of tissue sections to detect immune and stromal cell populations

Frozen sections of p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ spleen and LN were analyzed by immunofluorescence staining to study distribution and location of immune (Thy1.2⁺ and CD3⁺ T cells, MOMA⁺ MMM, B220⁺ B cells, CD11c⁺ DC) or stromal (α -5 integrin⁺ red pulp fibroblasts, RANKL⁺ MRC, gp38⁺CD31⁻ FRC, and gp38⁺CD31⁺ LEC) cell subsets (see Supporting Information online).

Immune response induction with heat-inactivated *Candida albicans*

Heat-inactivated *C. albicans* cells (10⁶) were injected into irradiated and unirradiated

mice (see Supporting Information online for details). Mice were sacrificed 5 days post-injection, and spleen and LN removed and analyzed by flow cytometry to study the CD4⁺ T cell population.

Flow cytometry analysis of immune cell populations

Secondary lymphoid organ cells from reconstituted and unreconstituted mice were processed and stained for flow cytometry analysis (see Supporting Information online).

Stromal cell network analysis with ImageJ “Texture Measure” plugin

We measured the local texture of each SLO region according to proposed texture descriptors [39], implemented in NIH-ImageJ software with the GLCM_Texture plugin (see details in Supporting Information online).

Immunofluorescence of cultured stromal cells

Stromal cells were isolated from p110δ^{WT/WT} spleen and LN as described [40], [41]. Extraction, culture and immunofluorescence of stromal cells are detailed in Supporting Information online.

qRT-PCR analysis of gene expression

RNA was extracted from spleen and LN from p110δ^{WT/WT} and p110δ^{D910A/D910A} mice. qRT-PCR was performed using specific primers for CCL19, CCL21, CXCL13, CCR7, CXCR5, lymphotoxinα (LTα), lymphotoxinβ (LTβ), lymphotoxinβR (LTβR) and TNFα (see Supporting Information online).

Statistics

Data are represented as mean ± SD. Most analyses were performed using Student's *t*-test to compare distinct parameters in two independent mouse groups (p110δ^{WT/WT} and p110δ^{D910A/D910A}). Where indicated, the Kolmogorov-Smirnov test was used to analyze samples whose

distribution is not Gaussian. In all cases, differences were considered significant for $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Results

Bone marrow reconstitution assays in homeostasis and after antigen stimulation

To determine whether the structural defects in $p110\delta^{D910A/D910A}$ mouse SLO ([30] and Fig. S1) are due solely to anomalies in $p110\delta^{D910A/D910A}$ lymphoid cell populations or also to stromal cell defects, we used bone marrow reconstitution assays in $p110\delta^{WT/WT}$ and $p110\delta^{D910A/D910A}$ mice and analyzed SLO in homeostatic conditions. Lethally irradiated $p110\delta^{WT/WT}$ and $p110\delta^{D910A/D910A}$ mice were reconstituted with total bone marrow from $p110\delta^{WT/WT}$ or $p110\delta^{D910A/D910A}$ donors. Six weeks after reconstitution, we sacrificed mice for immunofluorescent staining of spleen and LN sections to detect immune cell populations; we also analyzed total cell numbers and lymphoid cell populations of spleen and LN by flow cytometry.

To test whether $p110\delta^{D910A/D910A}$ mouse SLO structural defects in homeostasis are corrected following antigen stimulation, we performed similar studies in bone marrow-reconstituted mice after antigen stimulation. To study spleen and LN immune responses simultaneously, we used heat-inactivated *C. albicans*, which generates concurrent local and systemic immune responses ([42], [43], Fig. S2). We injected heat-inactivated *C. albicans* into mice 6 weeks after reconstitution, and sacrificed mice after five days (Fig. S2 and Supporting Materials and Methods online).

Immunofluorescence analysis of lymphoid cell populations from SLO and spleen follicles

Measurement of the distribution of lymphoid cell populations in spleen and LN from reconstituted mice (Fig. 1A, B) showed that the recipient mouse B cell, T cell, MMM and DC distribution pattern was conserved in SLO, regardless of whether it was reconstituted with $p110\delta^{WT/WT}$ or $p110\delta^{D910A/D910A}$ bone marrow (Fig. 1A, spleen; 1B, LN). The spleen follicle area in reconstituted $p110\delta^{WT/WT}$ mice resembled that of unreconstituted $p110\delta^{WT/WT}$ recipients, and reconstituted $p110\delta^{D910A/D910A}$ mouse spleen follicle area was similar to

that of unreconstituted $p110\delta^{D910A/D910A}$ mice. Recipient mouse phenotype thus remained comparable whether the mouse was reconstituted with $p110\delta^{WT/WT}$ or $p110\delta^{D910A/D910A}$ bone marrow (Fig. 1C). This result suggested that the effect of stromal cell subsets on immune cell distribution and localization is $p110\delta$ activity-dependent.

Total SLO cell numbers and CD4⁺ T cell response to heat-inactivated *C. albicans*

The heat-inactivated *C. albicans* antigen stimulation model induces CD4⁺ T cell expansion both in spleen and LN ([42], [43], Fig. S2); we therefore analyzed total CD3⁺CD4⁺ cell number in spleen and LN from unreconstituted and reconstituted mice in homeostasis and after antigen stimulation (Fig. 2, 3). We counted total cell number in SLO from both mouse types in homeostasis and after antigen treatment to confirm reconstitution efficiency (Fig. 2, 3).

Total cell numbers in unreconstituted $p110\delta^{WT/WT}$ mouse spleen increased after antigen stimulation, but not in spleens from $p110\delta^{D910A/D910A}$ mice (Fig. 2A). CD4⁺ T cell numbers in unreconstituted $p110\delta^{WT/WT}$ mouse spleen increased after antigen stimulation, but not in spleens from $p110\delta^{D910A/D910A}$ mice (Fig. 2B), suggesting defective CD4⁺ T cell expansion in $p110\delta$ -deficient mouse spleen. Mice of either type reconstituted with $p110\delta^{D910A/D910A}$ bone marrow showed a reduction in total spleen cell numbers (Fig. 2A), suggesting impaired reconstitution. Total spleen cell and CD4⁺ T cell numbers increased after antigen stimulation compared to homeostatic conditions in $p110\delta^{WT/WT}$ but not in $p110\delta^{D910A/D910A}$ recipient mice (Fig. 2A, B). This indicates that spleen stromal cells lacking $p110\delta$ might not contribute to a correct CD4⁺ T cell expansion in response to heat-inactivated *C. albicans*.

Lymph nodes from unreconstituted $p110\delta^{WT/WT}$ and $p110\delta^{D910A/D910A}$ mice show an increase in total cell number after antigen stimulation, which is smaller in $p110\delta^{D910A/D910A}$ than in $p110\delta^{WT/WT}$ mice (Fig. 3A). A similar increase was observed for total CD4⁺ T cells in LN (Fig. 3B), which indicates that $p110\delta^{WT/WT}$ and $p110\delta^{D910A/D910A}$ mouse LN might respond to *C. albicans* stimulation, although the response was slightly lower in $p110\delta^{D910A/D910A}$ than in $p110\delta^{WT/WT}$ mice. After reconstitution, total LN cell numbers tended to increase after

antigenic stimulation in p110 $\delta^{WT/WT}$, but not in p110 $\delta^{D910A/D910A}$ recipients (Fig. 3A). Results were similar for LN CD4⁺ T cells, suggesting that LN stroma is implicated in the CD4⁺ T cell immune response to heat-inactivated *C. albicans*, and that p110 δ contributes to this stromal cell function, although to a lesser extent than in spleen.

Analysis of p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ SLO stromal cell populations

To evaluate the stromal cell populations affected by lack of p110 δ , we performed immunofluorescence staining of histological sections from p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mouse SLO using markers for specific stromal cell subsets; we used anti- α -5 integrin for red pulp fibroblasts [1], RANKL for MRC from the marginal zone [1], [22], and gp38/podoplanin for FRC from the T cell area [1], [44] (Fig. 4A, B and C, respectively). We analyzed stromal texture with the ImageJ “Texture Measure” plugin, which measures textural features such as response of stromal image intensity to different image filters for a selected SLO region from each mouse type [39]. We found differences in these features between p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ spleens for all stromal cell subsets analyzed (Fig. 4); the largest differences were observed for FRC from the T cell area (Fig. 4C). As the FRC population is the most affected in p110 $\delta^{D910A/D910A}$ spleens, we analyzed FRC texture in p110 $\delta^{D910A/D910A}$ LN to determine whether these stromal cells are altered in these organs (Fig. S3). p110 $\delta^{D910A/D910A}$ LN gp38⁺ cells showed a distinct stromal texture from that of these cells in p110 $\delta^{WT/WT}$ LN (Fig. S3).

p110 δ expression in spleen and LN stromal cells from p110 $\delta^{WT/WT}$ mice

Isolation of sufficient numbers of highly purified stromal cell subsets for qRT-PCR or Western blot analysis of p110 δ expression is difficult. We therefore cultured stromal cells and used immunofluorescence to detect p110 δ and stromal cell markers (gp38 and CD31) [40] mainly to stain FRC, the stromal cell population most affected by lack of p110 δ (Fig. 4C). F4/80 staining was used to eliminate macrophage contamination. This method allowed us to detect p110 δ protein expression.

Immunofluorescence analysis of p110 δ expression in p110 $\delta^{WT/WT}$ spleen and LN tissue sections (Fig. 5A, B) and cultured FRC from spleen and LN (Fig. 5C, D) showed that all gp38⁺ cells expressed p110 δ (Fig. 5A-D). p110 δ is thus expressed not only in hematopoietic tissue, but also in gp38⁺ stromal cell populations. p110 δ is also expressed in gp38⁺CD31⁺ LN cells (lymphatic endothelial cells) (Fig. 5C, D, right), a stromal cell type involved in modulation of T cell-dependent immune responses [7].

qRT-PCR analysis of cytokine, chemokine and growth factor expression in p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ SLO RNA extracts

To study p110 δ function in SLO stromal cells, we selected a pool of genes linked to SLO stromal cell effects on immune cell function to test their expression in p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mouse spleen and LN. As FRC secrete CCL19 and CCL21, chemokines involved in T cell homing to SLO [3], [13], we used qRT-PCR to analyze their expression in spleen and LN total RNA extracts. Expression of CCL19, CCL21 and CXCL13 were lower in p110 δ -deficient than in WT spleens (Fig. 6A), whereas there were no differences in LN (Fig. 6B). Other genes implicated in SLO structural organization and lymphocyte homing (CCR7, CXCR5, LT α , LT β , LT β R, TNF α) showed no expression differences between genotypes in LN (Fig. 6B), although CCR7 and LT β R expression was higher in p110 $\delta^{D910A/D910A}$ than in p110 $\delta^{WT/WT}$ spleens (Fig. 6A). Stromal cells from p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mouse spleen might secrete low levels of chemokines involved in lymphocyte homing to SLO, thus impairing lymphocyte location and SLO function.

Discussion

The immune response is controlled by lymphoid cell function and by stromal cells from SLO [1]. The PI3K p110 δ isoform is expressed preferentially by leukocytes, although it is also expressed by other cell types [25], [26], [27], [28]. p110 $\delta^{D910A/D910A}$ and p110 δ -deficient mice have severe structural defects in SLO [30], [31], [32]. We tested whether this catalytic PI3K isoform is expressed in SLO stromal cells and might thus mediate cell functions that lead to their correct organization and in turn, affect the immune response.

p110 δ function has been studied extensively in various immune cell types [45]. Reconstitution assays are used to detect specific p110 δ functions in T cells, as reported for memory T cells [38], for which lethally irradiated WT mice were reconstituted with purified CFSE-labeled memory T cell subsets (CD62L^{hi} central memory T cells and CD62L^{lo} effector memory T cells) from p110 $\delta^{D910A/D910A}$ and p110 $\delta^{WT/WT}$ mice [38]. We used reconstitution assays with total bone marrow from p110 $\delta^{D910A/D910A}$ and p110 $\delta^{WT/WT}$ mice to determine whether stromal cells have a role in SLO reconstitution in various conditions (p110 $\delta^{WT/WT}$ -reconstituted p110 $\delta^{WT/WT}$, p110 $\delta^{WT/WT}$ -reconstituted p110 $\delta^{D910A/D910A}$, p110 $\delta^{D910A/D910A}$ -reconstituted p110 $\delta^{WT/WT}$, p110 $\delta^{D910A/D910A}$ -reconstituted p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice).

Reconstitution of either mouse genotype with p110 $\delta^{D910A/D910A}$ bone marrow reduced total cell numbers in spleen compared to mice reconstituted with p110 $\delta^{WT/WT}$ bone marrow, similar to reports for p110 δ /p110 γ double knockout mice [46]. A partial explanation for this reduction might be the defective chemotaxis to CXCL13 of p110 $\delta^{D910A/D910A}$ B cells, which leads to defective homing to SLO, particularly to spleen and Peyer's patches [47]. Moreover, we found reduced CXCL13 expression in p110 $\delta^{D910A/D910A}$ spleen whereas in LN there were no differences between p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice. This could also clarify why p110 $\delta^{D910A/D910A}$ -reconstituted LN do not show differences in total cell numbers relative to p110 $\delta^{WT/WT}$ -reconstituted LN (Fig. 2, 3). After reconstitution, T cells apparently migrated appropriately to spleen and LN, which coincides with reports that p110 δ -deficient T cells migrate correctly toward chemokines implicated in T cell homing to SLO (CCL19,

CCL21) [47]. p110 $\delta^{WT/WT}$ mice reconstituted with p110 $\delta^{D910A/D910A}$ bone marrow showed normal CD4 $^{+}$ T cell numbers (Fig. 2B, 3B), which were reduced in p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice reconstituted with p110 $\delta^{D910A/D910A}$ bone marrow; this suggests that SLO stromal cells have a role in T cell homing. When p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice were reconstituted with p110 $\delta^{WT/WT}$ bone marrow, SLO CD4 $^{+}$ T cell numbers did not increase in response to heat-inactivated *C. albicans*, suggesting that p110 $\delta^{D910A/D910A}$ stroma have a defect that impedes a correct immune response. We thus hypothesized a role for p110 δ in stromal cell function.

We studied stromal cell texture in p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mouse SLO, using markers for specific cell subsets, including α -5 integrin for spleen red pulp fibroblasts [1], RANKL for MRC from the spleen marginal zone and beneath the LN subcapsular sinus [1], [22], and gp38 for FRC from the spleen and LN T cell area [1], [44]. In spleen, we observed texture differences between p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice. As FRC were the stromal cell population most affected by p110 δ deficiency, we focused on these cells in LN. There were also texture differences in LN gp38 $^{+}$ stromal cells from p110 $\delta^{D910A/D910A}$ compared to p110 $\delta^{WT/WT}$ mice.

Although the p110 δ PI3K isoform is expressed in leukocytes and some other cell type, there are no studies describing p110 δ expression in SLO stromal cell subsets. We extracted and cultured stromal cells from p110 $\delta^{WT/WT}$ spleen and LN and tested for p110 δ protein expression by immunofluorescence staining. This method was preferred, as mRNA levels detected in qRT-PCR do not always correlate well with protein levels as defined by immunofluorescence. Fletcher [40] differentiated subgroups of stromal cell subsets from SLO, including LEC (gp38 $^{+}$ CD31 $^{+}$), which build lymphatic vessels from the LN capsule, FRC (gp38 $^{+}$ CD31 $^{-}$), which form a conduit network for antigen transport and support of immune cell migration, VEC (gp38 $^{-}$ CD31 $^{+}$), which construct cortical vessels, capillaries and HEV from LN, and double negative cells (gp38 $^{-}$ CD31 $^{-}$), whose exact function remains unknown [40]. We therefore immunofluorescent stained gp38, CD31, p110 δ and F4/80 markers (this last to identify contaminating macrophages, especially in spleen stromal cell subsets), and found that p110 δ is expressed in spleen FRC, and in LN FRC and LEC stromal

cell subsets. We found FRC in both SLO, as predicted [40], [48], but only identified LEC in LN stromal extracts. Although efferent lymphatic vessels (which would theoretically be gp38⁺CD31⁺) are reported in mouse spleen [49], the presence of gp38⁺CD31⁺ LEC in mouse spleen remains unclear [1].

FRC are reported to be crucial in immune response generation and antigen presentation [4], [5], and form a network in spleen and LN that supports T cell migration and homing [48], [50], and also secrete CCL19 and CCL21 [3]. We found reduced CCL19 and CCL21 expression in total RNA extracts from p110 δ ^{D910A/D910A} mouse spleen. The lack of p110 δ catalytic activity in FRC might impair immune response generation and/or correct T cell distribution in homeostasis and in inflammatory conditions.

Defects similar to those observed in our p110 δ ^{D910A/D910A} mouse spleens (abnormal white pulp structure, loss of marginal zone and B and T cell segregation) are found in LT α ^{-/-}, LT β ^{-/-} and LT β R^{-/-} mouse spleens [51], [52], [53]. We nonetheless observed no differences in LT α and LT β expression in spleen or LN between p110 δ ^{WT/WT} and p110 δ ^{D910A/D910A} mice. LT β R and CCR7 expression were increased in p110 δ ^{D910A/D910A} compared to p110 δ ^{WT/WT} mouse spleens. This might be a compensatory mechanism by which these receptors are overexpressed by other cells to compensate for the lack of LT β R-expressing FRC and reduced expression of the CCR7 ligands CCL19 and CCL21 in p110 δ ^{D910A/D910A} mouse spleens.

PI3K activity, and specifically that of p110 δ and p110 γ , is not needed for CCL21-mediated CD4⁺ T cell costimulation [54], and intrinsic T cell movement within LN after CCL19 or CCL21 stimulation of CCR7 is independent of PI3K activity [55]. As p110 δ -deficient T cells show no T cell migration defect towards gradients of the T cell homing chemokines CCL19 and CCL21 [47], we consider that the anomalies in p110 δ ^{D910A/D910A} SLO structure and function (especially those in spleen) could result from lack of sufficient stromal cells and/or impaired activity. p110 δ might affect stromal cell secretion of CCL19 and CCL21, chemokines necessary for functional T cell homing. Afferent lymphatic

vessels in LN but not in spleen have cells such as LEC that secrete some CCL21 [12], [56]; this could partially explain the lack of a CCL21 expression defect in p110 δ ^{D910A/D910A} mouse LN. CCL21 stimulates naïve T cell expansion and Th1 polarization of CD4⁺ T cells [57]; if p110 δ can control CCL21 secretion by stromal cells, it would influence CD4⁺ T cell immune responses.

Several studies point to FRC function in antigen presentation and establishment of peripheral tolerance [5], [58], [59]. Our results show that p110 δ is expressed in non-hematopoietic SLO gp38⁺ stromal cell subsets and highlight the importance of its expression in stromal cells to maintain SLO architecture, contributing to the preservation of immunocompetence.

Acknowledgements

We thank R. Mejías, R. Spada, L. Morillas, V. Mulens, E. García, A. Franco and A. Suárez-Fueyo for advice, protocols and helpful suggestions, S. Gutiérrez for help with image quantification, L. Almonacid for qRT-PCR studies and C. Mark for editorial assistance.

References

1. Mueller SN, Germain RN (2009) Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9: 618-629.
2. Scandella E, Bolinger B, Lattmann E, Miller S, Favre S, et al. (2008) Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nat Immunol* 9: 667-675.
3. Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG (2000) Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt* mouse. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97: 12694-12699.
4. Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, et al. (2007) Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* 8: 1255-1265.
5. Mueller SN, Ahmed R (2008) Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses. *Immunol Rev* 224: 284-294.
6. Khan O, Headley M, Gerard A, Wei W, Liu L, et al. (2011) Regulation of T cell priming by lymphoid stroma. *PLoS One* 6: e26138.
7. Lukacs-Kornek V, Malhotra D, Fletcher AL, Acton SE, Elpek KG, et al. (2011) Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat Immunol* 12: 1096-1104.
8. Siegert S, Huang HY, Yang CY, Scarpellino L, Carrie L, et al. (2011) Fibroblastic reticular cells from lymph nodes attenuate T cell expansion by producing nitric oxide. *PLoS One* 6: e27618.
9. Siegert S, Luther SA (2012) Positive and negative regulation of T cell responses by fibroblastic reticular cells within paracortical regions of lymph nodes. *Front Immunol* 3: 285.

10. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, et al. (2000) Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* 176: 181-193.
11. Katakai T, Hara T, Sugai M, Gonda H, Shimizu A (2004) Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med* 200: 783-795.
12. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, et al. (1998) A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95: 258-263.
13. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, et al. (1999) Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189: 451-460.
14. Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher LA, Gonzalez SF, Verschoor A, et al. (2009) Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity* 30: 264-276.
15. Mebius RE, Kraal G (2005) Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5: 606-616.
16. Mebius RE, Rennert P, Weissman IL (1997) Developing lymph nodes collect CD4+CD3-LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* 7: 493-504.
17. Honda K, Nakano H, Yoshida H, Nishikawa S, Rennert P, et al. (2001) Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J Exp Med* 193: 621-630.
18. Kim CH (2005) The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. *Curr Opin Hematol* 12: 298-304.
19. Kim MY (2008) Roles of embryonic and adult lymphoid tissue inducer cells in primary

and secondary lymphoid tissues. *Yonsei Med J* 49: 352-356.

20. Kim MY, Gaspal FM, Wiggett HE, McConnell FM, Gulbranson-Judge A, et al. (2003) CD4(+)CD3(-) accessory cells costimulate primed CD4 T cells through OX40 and CD30 at sites where T cells collaborate with B cells. *Immunity* 18: 643-654.

21. Kim MY, Anderson G, White A, Jenkinson E, Arlt W, et al. (2005) OX40 ligand and CD30 ligand are expressed on adult but not neonatal CD4+CD3- inducer cells: evidence that IL-7 signals regulate CD30 ligand but not OX40 ligand expression. *J Immunol* 174: 6686-6691.

22. Katakai T (2012) Marginal reticular cells: a stromal subset directly descended from the lymphoid tissue organizer. *Front Immunol* 3: 200.

23. Katakai T, Suto H, Sugai M, Gonda H, Togawa A, et al. (2008) Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J Immunol* 181: 6189-6200.

24. So L, Fruman DA (2012) PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: new developments and therapeutic advances. *Biochem J* 442: 465-481.

25. Eickholt BJ, Ahmed AI, Davies M, Papakonstanti EA, Pearce W, et al. (2007) Control of axonal growth and regeneration of sensory neurons by the p110delta PI 3-kinase. *PLoS One* 2: e869.

26. Sawyer C, Sturge J, Bennett DC, O'Hare MJ, Allen WE, et al. (2003) Regulation of breast cancer cell chemotaxis by the phosphoinositide 3-kinase p110delta. *Cancer Res* 63: 1667-1675.

27. Geng L, Tan J, Himmelfarb E, Schueneman A, Niermann K, et al. (2004) A specific antagonist of the p110delta catalytic component of phosphatidylinositol 3'-kinase, IC486068, enhances radiation-induced tumor vascular destruction. *Cancer Res* 64: 4893-4899.

28. Puri KD, Doggett TA, Douangpanya J, Hou Y, Tino WT, et al. (2004) Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood* 103: 3448-3456.
29. Puri KD, Gold MR (2012) Selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase delta: modulators of B-cell function with potential for treating autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *Front Immunol* 3: 256.
30. Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, Priddle H, Sancho S, et al. (2002) Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 297: 1031-1034.
31. Clayton E, Bardi G, Bell SE, Chantry D, Downes CP, et al. (2002) A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J Exp Med* 196: 753-763.
32. Jou ST, Carpino N, Takahashi Y, Piekorz R, Chao JR, et al. (2002) Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol* 22: 8580-8591.
33. Rolf J, Bell SE, Kovesdi D, Janas ML, Soond DR, et al. (2010) Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction. *J Immunol* 185: 4042-4052.
34. Patton DT, Garden OA, Pearce WP, Clough LE, Monk CR, et al. (2006) Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110 delta is critical for the function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 177: 6598-6602.
35. Papakonstanti EA, Zwaenepoel O, Bilancio A, Burns E, Nock GE, et al. (2008) Distinct roles of class IA PI3K isoforms in primary and immortalised macrophages. *J Cell Sci* 121: 4124-4133.
36. Okkenhaug K, Ali K, Vanhaesebroeck B (2007) Antigen receptor signalling: a distinctive

role for the p110delta isoform of PI3K. *Trends Immunol* 28: 80-87.

37. Liu D, Zhang T, Marshall AJ, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, et al. (2009) The p110delta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase controls susceptibility to *Leishmania major* by regulating expansion and tissue homing of regulatory T cells. *J Immunol* 183: 1921-1933.

38. Liu D, Uzonna JE (2010) The p110 delta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase controls the quality of secondary anti-*Leishmania* immunity by regulating expansion and effector function of memory T cell subsets. *J Immunol* 184: 3098-3105.

39. Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I (1973) Textural Features for Image Classification. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 3: 610-621.

40. Fletcher AL, Malhotra D, Acton SE, Lukacs-Kornek V, Bellemare-Pelletier A, et al. (2011) Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. *Front Immunol* 2: 35.

41. Rehm A, Mensen A, Schradi K, Gerlach K, Wittstock S, et al. (2011) Cooperative function of CCR7 and lymphotoxin in the formation of a lymphoma-permissive niche within murine secondary lymphoid organs. *Blood* 118: 1020-1033.

42. Rosati E, Scaringi L, Cornacchione P, Fettucciari K, Sabatini R, et al. (1995) Cytokine response to inactivated *Candida albicans* in mice. *Cell Immunol* 162: 256-264.

43. Scaringi L, Rosati E, Cornacchione P, Fettucciari K, Sabatini R, et al. (1995) Local and systemic immune response to inactivated *Candida albicans* in mice. *Nat Immun* 14: 234-249.

44. Farr AG, Berry ML, Kim A, Nelson AJ, Welch MP, et al. (1992) Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. *J Exp Med* 176: 1477-1482.

45. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B (2003) PI3K in lymphocyte development,

differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* 3: 317-330.

46. Beer-Hammer S, Zebedin E, von Holleben M, Alferink J, Reis B, et al. (2010) The catalytic PI3K isoforms p110gamma and p110delta contribute to B cell development and maintenance, transformation, and proliferation. *J Leukoc Biol* 87: 1083-1095.

47. Reif K, Okkenhaug K, Sasaki T, Penninger JM, Vanhaesebroeck B, et al. (2004) Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol* 173: 2236-2240.

48. Bajenoff M, Glaichenhaus N, Germain RN (2008) Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. *J Immunol* 181: 3947-3954.

49. Pellas TC, Weiss L (1990) Deep splenic lymphatic vessels in the mouse: a route of splenic exit for recirculating lymphocytes. *Am J Anat* 187: 347-354.

50. Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, et al. (2006) Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 25: 989-1001.

51. Banks TA, Rouse BT, Kerley MK, Blair PJ, Godfrey VL, et al. (1995) Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol* 155: 1685-1693.

52. Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, et al. (1997) Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 6: 491-500.

53. Futterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K (1998) The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 9: 59-70.

54. Gollmer K, Asperti-Boursin F, Tanaka Y, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, et al. (2009)

CCL21 mediates CD4⁺ T-cell costimulation via a DOCK2/Rac-dependent pathway. *Blood* 114: 580-588.

55. Asperti-Boursin F, Real E, Bismuth G, Trautmann A, Donnadieu E (2007) CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. *J Exp Med* 204: 1167-1179.

56. Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, et al. (2001) Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med* 194: 797-808.

57. Flanagan K, Moroziewicz D, Kwak H, Horig H, Kaufman HL (2004) The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4⁺ T cells. *Cell Immunol* 231: 75-84.

58. Fletcher AL, Lukacs-Kornek V, Reynoso ED, Pinner SE, Bellemare-Pelletier A, et al. (2010) Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J Exp Med* 207: 689-697.

59. Lukacs-Kornek V, Turley SJ (2011) Self-antigen presentation by dendritic cells and lymphoid stroma and its implications for autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 23: 138-145.

Figure legends

Figure 1. Immunofluorescence analysis of immune cell distribution and follicle area measurement in reconstitution assays. Frozen sections of spleen and LN from p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice were immunofluorescence-stained to detect T cells (CD3 $^{+}$, Thy1.2 $^{+}$), B cells (B220 $^{+}$), MMM (MOMA $^{+}$) and DC (CD11c $^{+}$) in (A) spleen sections and in (B) LN sections for all reconstitution conditions ($n = 4-6$ mice/condition). Bar = 200 μ m. (C) Measurement of spleen follicle area for each reconstitution conditions in spleen hematoxylin/eosin-stained frozen sections, quantified with ImageJ software. Mean \pm SD; Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0.001$.

Figure 2. Total cell number and CD4 $^{+}$ T cells in p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mouse spleen after reconstitution. Spleens were extracted for each condition (unreconstituted and reconstituted p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice) in homeostatic and in inflammatory conditions (five days post-*C. albicans* injection). Whole organ cell suspensions were counted to determine total cell number (A) and stained to determine CD4 $^{+}$ T cell numbers by flow cytometry (B) ($n = 2-4$ mice/condition). Mean \pm SD; Student's *t*-test, $p < 0.05$ and $p < 0.01$.

Figure 3. Total cell number and CD4 $^{+}$ T cells in p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mouse lymph nodes after reconstitution. Lymph nodes were extracted for each condition as in Fig. 2. Whole organ cell suspensions were counted to determine total cell number (A) and stained to determine CD4 $^{+}$ T cell number in flow cytometry (B) ($n = 2-4$ mice/condition). Mean \pm SD; Student's *t*-test, $p < 0.05$ and $p < 0.01$.

Figure 4. Analysis of p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ spleen stromal cell populations. Spleen sections from p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice were immunofluorescent-stained for stromal cell markers (A) α -5 integrin for red pulp fibroblasts ($n = 5$ mice/genotype), (B) RANKL for marginal reticular cells from the marginal zone ($n = 4$ mice/genotype) and (C) gp38 for fibroblastic reticular cells from the T cell area ($n = 3$ p110 $\delta^{WT/WT}$ mice and $n = 4$ p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice). Stromal texture was measured using the ImageJ Texture Measure

plugin ($p < 0.05$); graphs showing differences are shown (right). A classifier with the $p110\delta^{WT/WT}$ and $p110\delta^{D910A/D910A}$ labels and the texture measurements described in Haralick [39] was trained. Classification accuracy (red line) was measured and compared to classification accuracy when the $p110\delta^{WT/WT}$ and $p110\delta^{D910A/D910A}$ labels are randomly assigned to input samples. Departure from this distribution indicates the significance of the classification, and thus the actual separation between $p110\delta^{WT/WT}$ and $p110\delta^{D910A/D910A}$ textures.

Figure 5. $p110\delta$ expression in spleen and lymph node stromal cells from $p110\delta^{WT/WT}$ mice. (A) Immunofluorescent staining of $p110\delta$ and gp38 in spleen and LN sections from $p110\delta^{WT/WT}$ mice ($n = 6-7$). Bar = 50 μm . (B) Quantification of immunofluorescent staining of stromal cells in tissue sections from $p110\delta^{WT/WT}$ mouse spleen and LN ($n = 6-7$). (C) Immunofluorescence of cultured stromal cells from spleen and LN from $p110\delta^{WT/WT}$ mice to detect $p110\delta$, gp38 and F4/80 or CD31. Bar = 50 μm . (D) Quantification of immunofluorescent staining of cultured stromal cells ($n = 5$ experiments for spleen and $n = 3$ experiments for LN stromal cells).

Figure 6. qRT-PCR analysis of cytokine, chemokine and growth factor expression in $p110\delta^{WT/WT}$ and $p110\delta^{D910A/D910A}$ secondary lymphoid organs. Total RNA was extracted from $p110\delta^{WT/WT}$ and $p110\delta^{D910A/D910A}$ spleen and LN ($n = 5$ mice/genotype). Expression of CCL19, CCL21, CXCL13, CCR7, CXCR5, $\text{LT}\alpha$, $\text{LT}\beta$, $\text{LT}\beta\text{R}$, $\text{TNF-}\alpha$ was analyzed for spleen (A) and LN (B). Mean $\log 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ for each genotype is shown. $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Student's t -test, ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$).

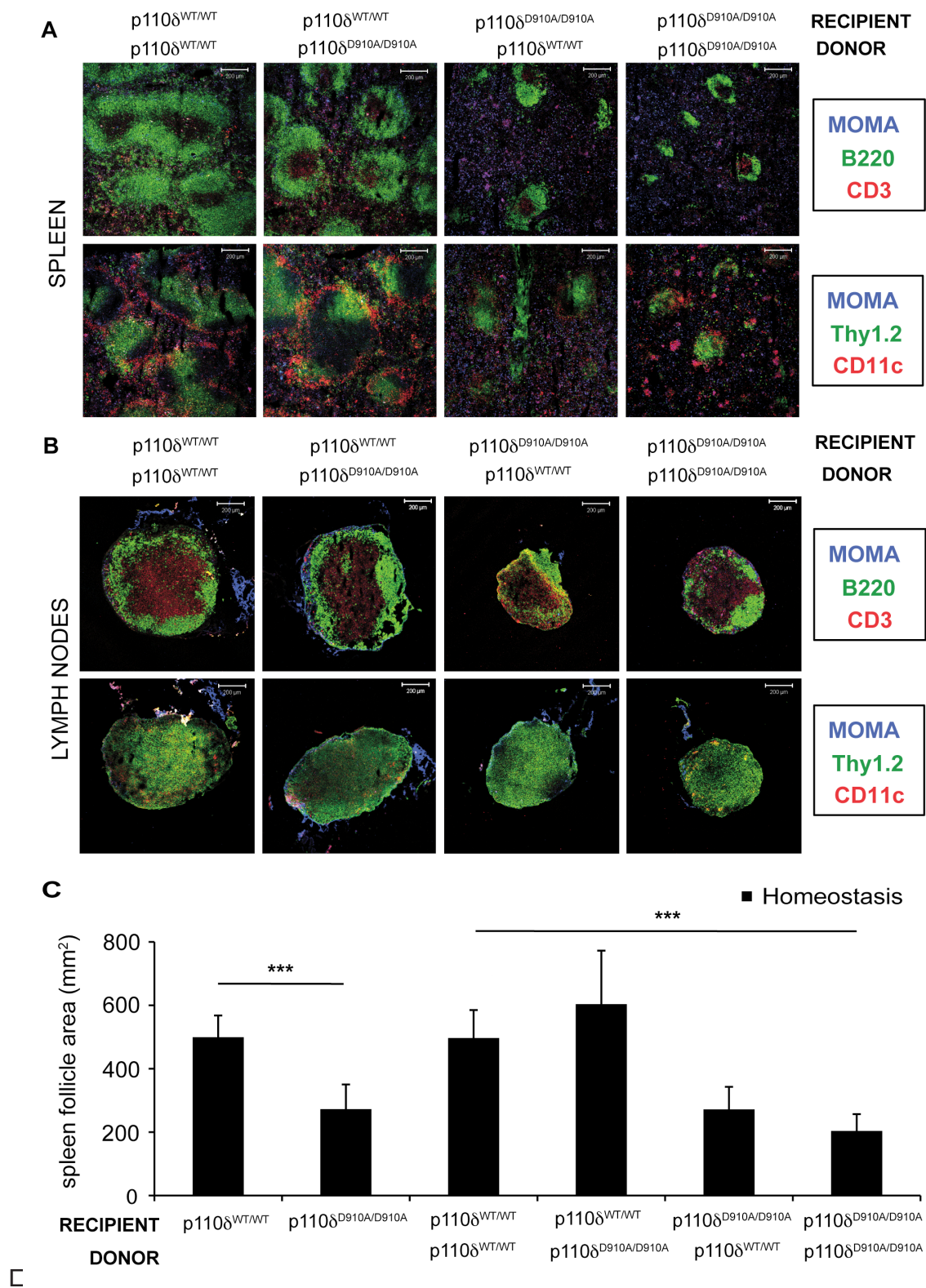


Figure 1

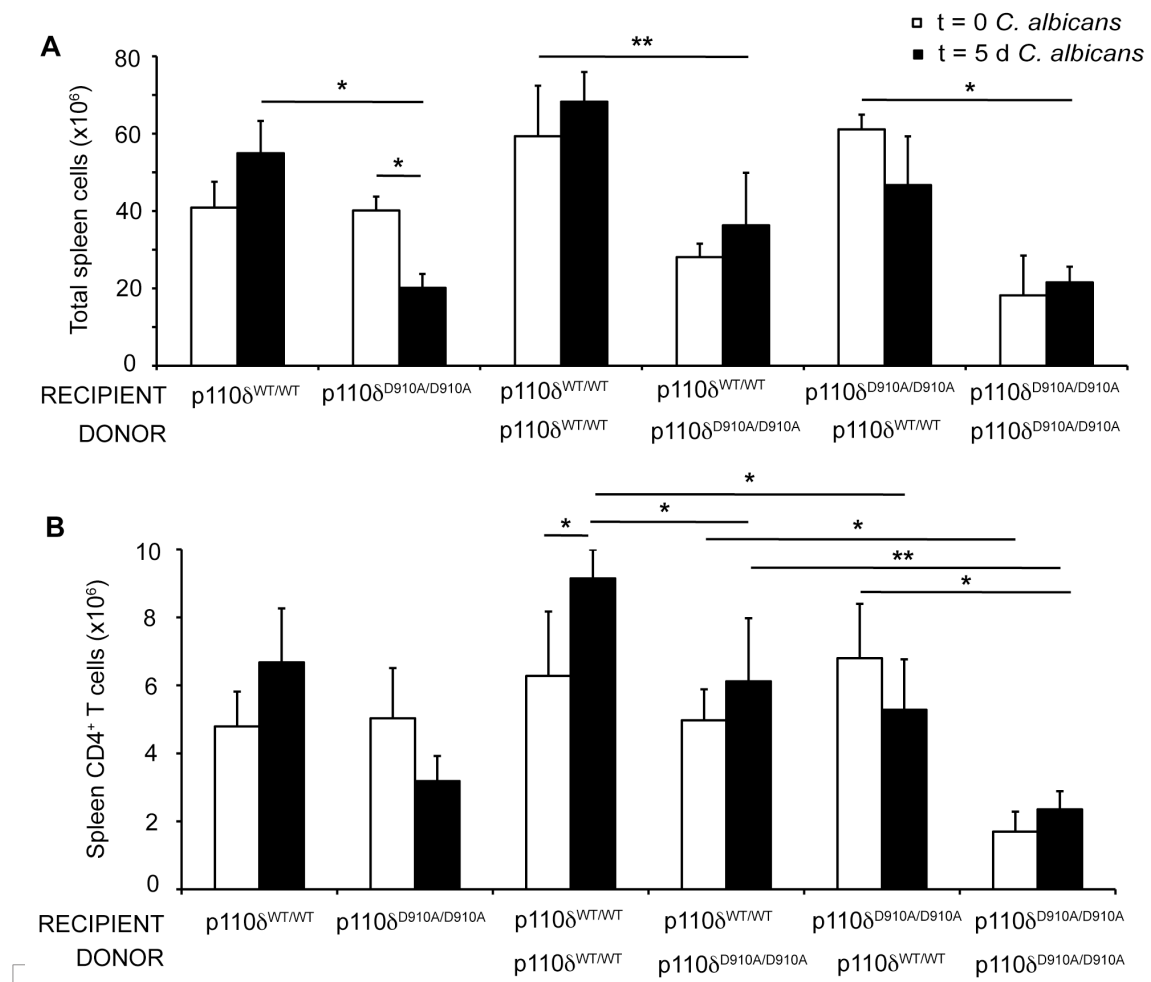


Figure 2

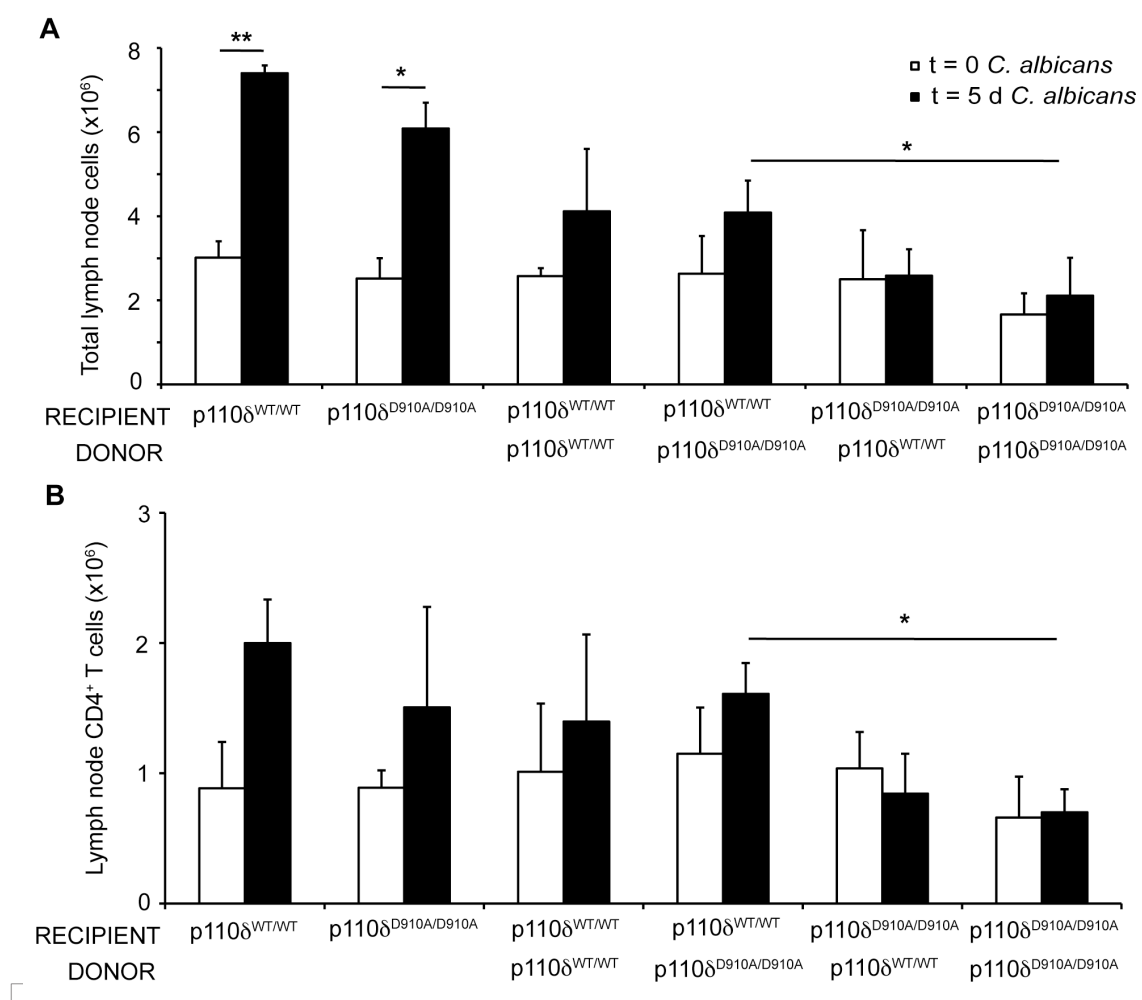


Figure 3

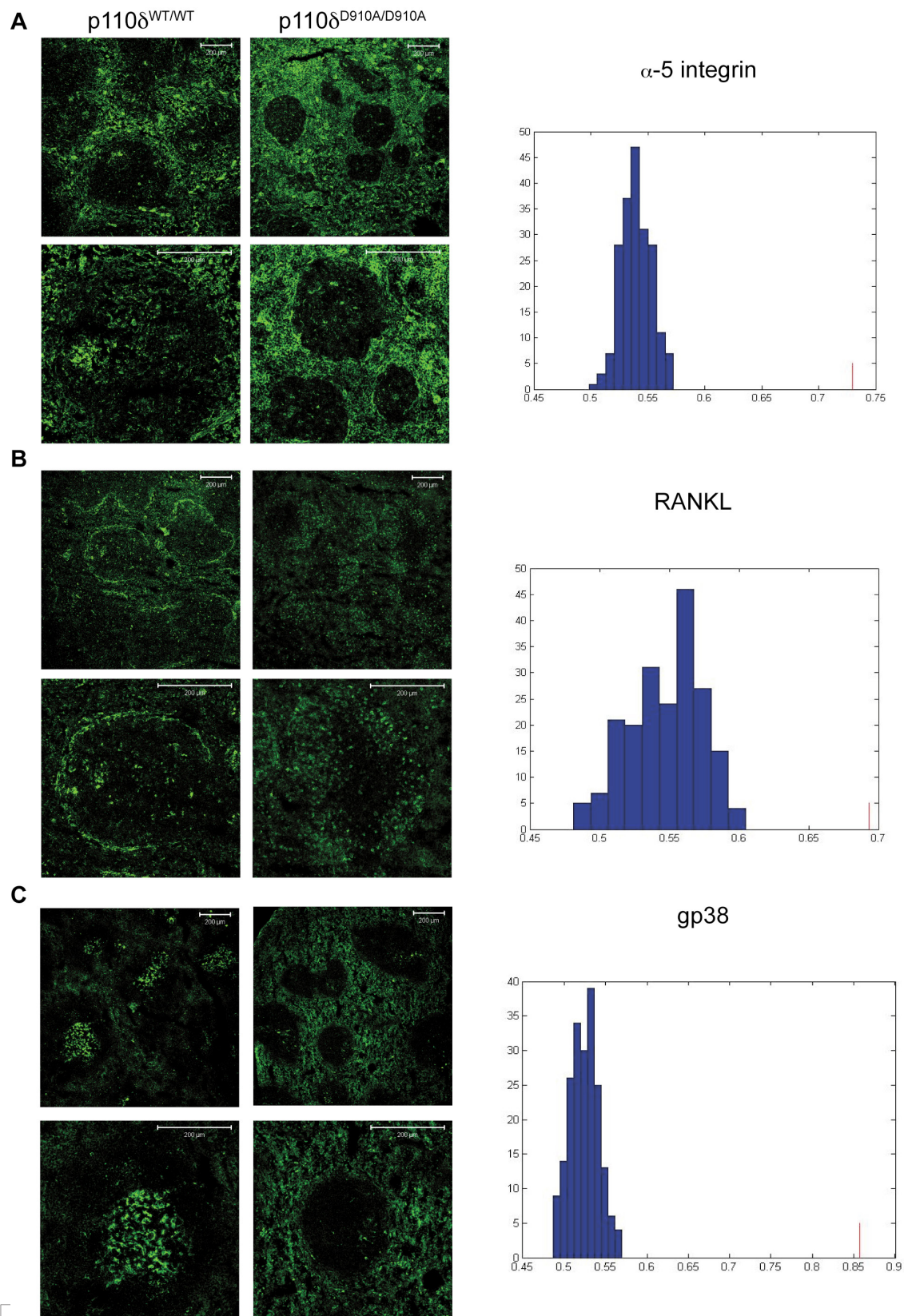


Figure 4

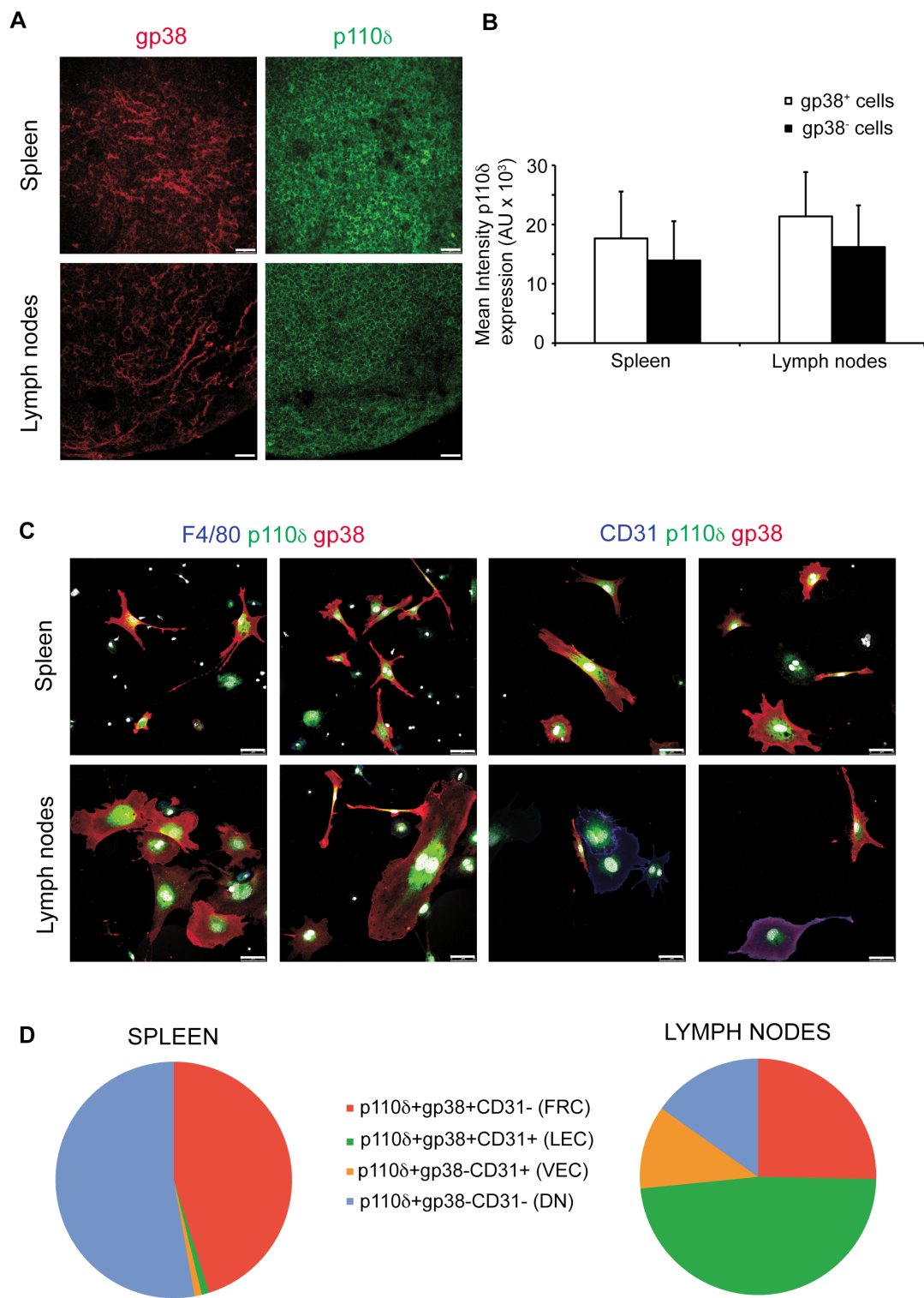


Figure 5

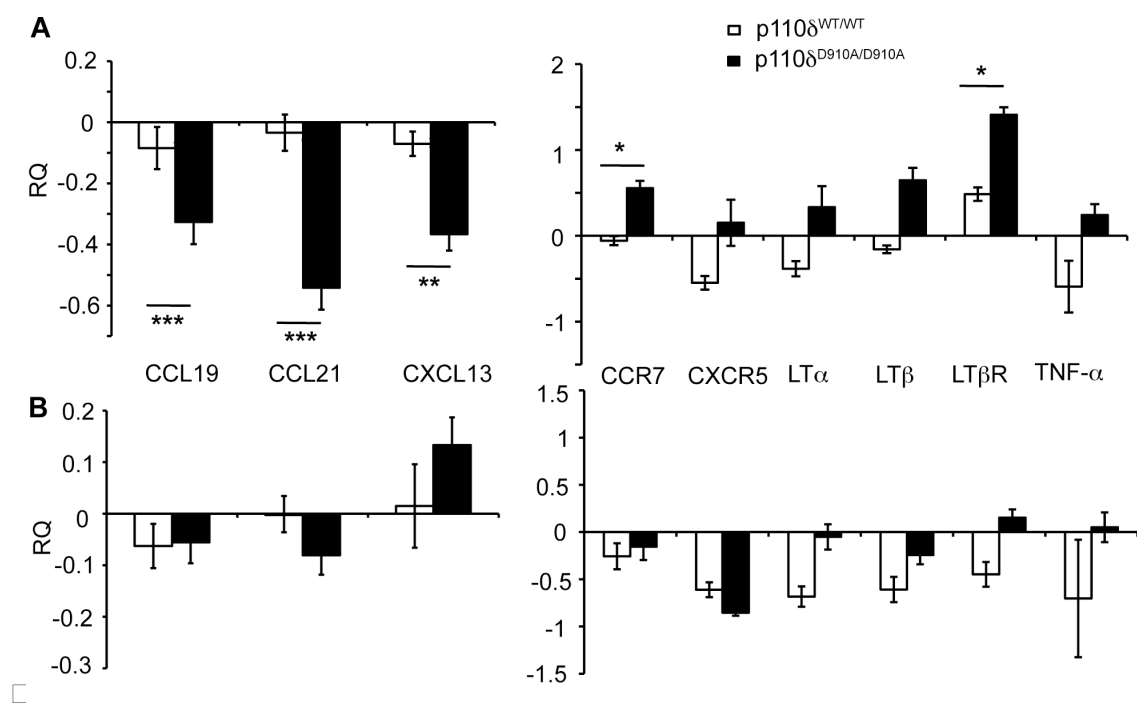


Figure 6

SUPPORTING INFORMATION

Supporting Materials and Methods

Hematoxylin-eosin staining of frozen spleen sections

Serial sections from p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ spleens were defrosted (RT, 45 min), fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 10 min), washed in distilled water (3 x 3 min) and in running water (3 min). They were then incubated in Mayer's hematoxylin (Sigma; 15 min) and washed in water (10 min). Sections were incubated in 1% eosin (2-4 min), washed twice in 70% ethanol, dehydrated in 95% ethanol (3 min), 100% ethanol (3 min) and xylene (3 min), slides were mounted in Entellan (Merck) and dried at 37°C. Images were acquired using a Leica microscope (vertical Leitz DM RB) with an adapted Olympus (DP70) camera.

Immunofluorescence of tissue sections to detect immune and stromal cell populations

Frozen sections from p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ spleen and paraaortic lymph nodes (LN) were stored at -80°C. Before staining, slides were thawed (RT, 45 min) until sections were completely dry, then fixed in 4% PFA (RT, 10 min) and washed in PBS. When using biotinylated antibodies, sections were pretreated with the Avidin/Biotin Blocking kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA), slides were incubated in blocking solution ((1% bovine serum albumin (BSA; Sigma) + 10% goat serum in PBS; RT, 30 min)) and incubated without washing (4°C, overnight (o/n)) with primary antibody (rat anti-mouse CD45R/B220, purified hamster anti-mouse CD3 for IHQ, rat anti-mouse CD90.2/Thy1.2 (all from BD Pharmingen, San Diego, CA), monoclonal anti-mouse metallophilic macrophages/MOMA-biotin (Acris Antibodies, Herford, Germany), purified hamster anti-mouse CD11c (Caltag Labs, Buckingham, UK), monoclonal rat anti-mouse CD49e/ α -5 integrin (AbD Serotec, Kidlington, UK), purified anti-mouse TRANCE/RANKL, or purified hamster anti-mouse gp38/podoplanin (two last from eBioscience, San Diego,

CA)). Sections were washed with PBS and incubated (RT, 45 min) with the appropriate secondary antibody (streptavidin-Cy5, goat anti-rat-Alexa488, goat anti-hamster IgG-Cy3 (all from Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA)). Slides were washed again and mounted in Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL).

***Candida albicans* growth and inactivation**

Candida albicans, obtained from the National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF-3153, serotype A), is a nonpathogenic strain (ATCC 36801; Biosafety level 1). It was cultured in YPD yeast medium (0.2% bacto yeast extract, 0.1% bacto peptone (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) in distilled water) supplemented with 2 M glucose and ampicillin (1/1000). The sample was diluted several times in liquid YPD medium and cultured in YPD agar (0.2% bacto yeast extract + 0.1% bacto peptone + 0.24% agar (BD Biosciences); 24°C, 24-48 h). A single colony from one plate was cultured in 500 ml liquid YPD medium (130 rpm, 24°C, 18 h) to obtain a yeast suspension, which was centrifuged (750 xg, 4°C, 1 h), the pellet washed in sterile PBS, and centrifuged again (750 xg, 4°C, 1 h). This *C. albicans* pellet was heat-inactivated by incubation in a water bath (65-67°C, 4 h) and tubes shaken every 10-15 min (inactivation was confirmed by lack of *C. albicans* growth after culture in YPD agar (24°C, 48-72 h)). *C. albicans* aliquots were stored in sterile PBS (4 x 10⁸ cells/ml, 4°C).

Immune response induction by injection of heat-inactivated *C. albicans*

To confirm in our p110 $\delta^{WT/WT}$ mice that heat-inactivated *C. albicans* injection induced a CD4⁺ T cell systemic expansion as reported (1), (2), we intraperitoneal (i.p.) injected 10⁶ heat-inactivated *C. albicans* cells in p110 $\delta^{WT/WT}$ mice. We analyzed total CD4⁺ T cell numbers in spleen and paraaortic LN at various times post-inoculation (2, 5, 7, 9 or 21 days) by flow cytometry. We chose paraaortic LN as they are the major LN which drain the peritoneal cavity. We found CD4⁺ T cell expansion in p110 $\delta^{WT/WT}$ spleen and LN (Fig. S2A, B).

Flow cytometry analysis of immune cell populations

Single-cell suspensions were obtained from spleen, peripheral and paraaortic LN. Total cells were counted by Trypan blue dye exclusion. Cells ($0.5-1 \times 10^6$ cells/well) were plated in 96-well plates and washed twice in staining PBS (1% fetal calf serum (FCS) + 0.5% BSA + 0.065% NaN_3 in PBS). Between washes, plates were centrifuged ($800 \times g$, 4°C , 5 min). Cells were incubated in the dark with appropriate antibodies (anti-mouse CD3-APC-eFluor780 (eBioscience) and anti-mouse CD4-PE (Beckman Coulter, Indianapolis, IN)) (4°C , 20 min), then washed in staining PBS and transferred to cytometry tubes for FACS analysis (Gallios Flow Cytometer, Beckman Coulter). Data were analyzed with Kaluza software.

Stromal cell network analysis with the ImageJ “Texture Measure” plugin

We measured local texture of each region of SLO sections according to the texture descriptors proposed by Haralick (3), as implemented in ImageJ by the GLCM_Texture plugin. We measured five texture descriptors at four orientations (0, 90, 180 and 270 degrees) and at two pixel steps (1 and 3). This analysis produced a 40-dimensional vector for each patch analyzed, which were subjected to a Principal Component Analysis (4) and classified in Matlab using Linear Discriminant Analysis with a Mahalanobis estimate of the class covariances. The significance of classification accuracy was computed by randomizing class labels and computing the distribution of the classification accuracy in this random case.

p110 δ immunofluorescence staining in SLO tissue sections from p110 $\delta^{\text{WT/WT}}$ mice

Frozen sections from p110 $\delta^{\text{WT/WT}}$ spleen and paraaortic LN were stored at -80°C . Before staining, slides were thawed (RT, 45 min) until sections were completely dry, then fixed in 4% PFA (RT, 10 min). After washing in PBS, sections were treated with blocking solution (1% BSA (Sigma) + 10% goat serum in PBS; RT, 30 min) and incubated with antibodies to membrane proteins (hamster anti-mouse gp38/podoplanin) (4°C , o/n). Slides

were washed in PBS and incubated with secondary antibodies (goat anti-hamster IgG-Cy3 (Molecular Probes/Invitrogen); RT, 45 min). To label intracellular proteins, cells were blocked and permeabilized (1% BSA + 10% goat serum in PBS with 0.1% Triton X100; RT, 30 min), incubated with primary antibody (anti-p110 δ , Abcam, Cambridge, UK; 4°C, o/n), followed by secondary antibody to p110 δ (goat anti-rabbit-Alexa488 (Molecular Probes/Invitrogen); RT, 45 min). Sections were DAPI-stained (1/300 in 1% BSA in PBS; RT, 10 min) and mounted in Fluoromount-G (Southern Biotech). Images were obtained in a Leica SP5 confocal microscope and analyzed with ImageJ.

Quantification of p110 δ immunofluorescence staining in SLO tissue sections from p110 $\delta^{WT/WT}$ mice

We measured the difference between positive and negative samples in spleen and LN on each of the fluorescent channels. For spleen and LN, we used seven representative images; within each image, we measured average intensity at five positive and five negative locations and computed intensity difference for all 25 possible combinations. We repeated this process for each of the seven samples and aggregated the differences in a single vector. Finally, we computed the *a posteriori* probability that this difference was smaller than 0 (reported as p-value). This procedure eliminates possible intensity differences among images, and provides a simple means of testing the hypothesis that the difference between positive and negative is positive (a one-tailed test).

Isolation and culture of spleen and lymph node stromal cells

Spleen and peripheral LN (axillary and inguinal) were extracted from p110 $\delta^{WT/WT}$ mice and used to obtain stromal cell populations as described (5), (6). We extracted peripheral LN as they contain higher percentage of FRC than mesenteric LN (5) and we wanted to isolate FRC. SLO were minced and washed in serum-free RPMI-1640 medium (Lonza, Walkersville, MD). Material was pooled (maximum 5 spleens/pool; maximum LN from 7 mice/pool) and incubated with an enzyme mix (1 mg/ml collagenase D (spleen pool, 37°C, 35 min) or 0.8 mg/ml collagenase D + 0.8 mg/ml dispase, both from Roche (LN pool,

37°C, 20 min)). Spleen and LN pools were then resuspended to reduce tissue aggregates. Supernatant was collected with 10 ml wash buffer (2% fetal bovine serum (FBS), 5 mM EDTA in PBS), centrifuged (300 xg, 4°C, 5 min) and the pellet maintained on ice. This step was repeated four times until most tissue was disaggregated. Pellets from these pools were collected and resuspended in FRC medium (MEM medium, alpha modification (Sigma) supplemented with 1% antibiotics and 10% FBS). Total cells were counted and plated in the same medium ($3-5 \times 10^6$ cells/ml). Medium was changed 24 h after plating and every two days thereafter.

p110 δ immunofluorescence staining in cultured stromal cells

Stromal cells were detached as described (5). Coverslips were pretreated with poly-L-lysine (1/10; Sigma) for at least 3 h (37°C), then washed twice in sterile, filtered PBS. Coverslips were placed in 6-well culture plates, detached cells were added in FRC medium (5×10^4 cells/ml) and allowed to adhere (37°C, o/n). FRC medium was removed and cells fixed in 4% PFA (RT, 20 min). After washing in PBS cells were treated with blocking solution (1% BSA (Sigma) + 10% goat serum in PBS; RT, 30 min) and incubated with antibodies to membrane proteins (hamster anti-mouse gp38/podoplanin and rat anti-mouse CD31 (BD Biosciences) or purified anti-F4/80 (AbD Serotec); 4°C, o/n). Cells were washed in PBS and incubated with secondary antibodies (goat anti-hamster IgG-Cy3 and goat anti-rat IgG-A647 (Molecular Probes/Invitrogen); RT, 45 min). To label intracellular proteins, cells were blocked and permeabilized (1% BSA + 10% goat serum in PBS with 0.1% Triton X100; RT, 30 min), incubated with primary antibody (anti-p110 δ ; 4°C, o/n), followed by secondary antibody to p110 δ (goat anti-rabbit-Alexa488 (Molecular Probes/Invitrogen); RT, 45 min). Cells were DAPI-stained (1/300 in 1% BSA in PBS; RT, 10 min). Finally, cells were washed in distilled water and mounted in Fluoromount-G (Southern Biotech). Images were obtained in a Leica SP5 confocal microscope and analyzed with ImageJ.

qRT-PCR analysis of gene expression

RNA was extracted with TRI Reagent (Sigma) from homogenates of frozen spleen and

peripheral LN from p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice. cDNA was obtained from 1 μ g total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 496 thermocycler (MWG AG Biotech, Ebersberg, Germany). Several dilutions of each cDNA were used as templates for PCR amplification in an ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) using HOTFire Pol 5x buffer (Solis Biodyne, Tartu, Estonia). Oligonucleotide primers used were CCL19, CCL21, CXCL13, CCR7, CXCR5, lymphotoxin α (LT α), lymphotoxin β (LT β), lymphotoxin β R (LT β R), TNF α ; amplification was performed at 95°C, 10 min; 40 cycles, 95°C, 15 sec; 60°C, 20 sec; 72°C, 30 sec. To confirm amplification purity, a dissociation curve was generated at 95°C, 15 sec; 60°C, 15 sec and 2% ramp to 95°C. For p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$, mRNA levels were normalized to a p110 $\delta^{WT/WT}$ control, using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method for relative quantification of real-time quantitative PCR data. Results were analyzed using SDS v2.2.2.

Gene	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')
CCL19	TGGTTCTCTGGACCTTCCCA	CACGATGTTCCCAGGGATG
CCL21	GGGAAACAAAGCCCCGG	GCTGTGTCTGTTCAAGTCTCTTG
CXCL13	GATTCAAGTTACGCCCCCTG	ACCATTTGGCACGAGGATTC
CCR7	CAAAAGCACAGCCTTCCTGTG	AAATGACAAGGAGAGCCACCA
CXCR5	ATCAGACAGTGACCAGCCTGGT	CGTGCTGTTACTGTAGAAGGCC
LTα	CACACTGCCGCTTCCTCTAT	CCGAGCAGTGTCATGTGG
LTβ	CCTGGTGACCCTGTTGTTG	TGCTCCTGAGCCAATGATCT
LTβR	GCTCCAGGTACCTCCTACTCG	ATGGCCAGCAGTAGCATTG
TNFα	CTGTAGCCACGTCGTAGC	TTGAGATCCATGCCGTTG
GAPDH	AGAAACCCTGGACCACCCA	CTCCCTCACAATTTCCATCCC
RNA 18s	GAGAAACGGCTACCACATCC	GGGTCGGGAGTGGGTAAT
β-actin	GGCTCCTAGCACCATGAAGA	CCACCGATCCACACAGAGTA

Supporting Results

Immune cell type distribution in the marginal zone of p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mouse spleen

Secondary lymphoid organs from p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice have structural defects (7). We studied the distribution of various spleen cell types by immunofluorescence staining of frozen spleen sections from p110 $\delta^{WT/WT}$ and p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice. Marginal zone cell types were disorganized in p110 $\delta^{D910A/D910A}$ mice; this region is crucial for development of a correct immune response to blood-borne antigens (reviewed in 8). The main immune cell types whose distribution was affected were MMM and MZB (Fig. S1A, 9) and MZM (Fig. S1B).

Supporting References:

1. Rosati E, Scaringi L, Cornacchione P, Fettucciari K, Sabatini R, et al. (1995) Cytokine response to inactivated *Candida albicans* in mice. *Cell Immunol* 162: 256-264.
2. Scaringi L, Rosati E, Cornacchione P, Fettucciari K, Sabatini R, et al. (1995) Local and systemic immune response to inactivated *Candida albicans* in mice. *Nat Immun* 14: 234-249.
3. Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I (1973) Textural Features for Image Classification. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 3: 610-621.
4. Pearson K (1901) On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space *Philos Mag* 2: 559-572.
5. Fletcher AL, Malhotra D, Acton SE, Lukacs-Kornek V, Bellemare-Pelletier A, et al. (2011) Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. *Front Immunol* 2: 35.
6. Rehm A, Mensen A, Schradi K, Gerlach K, Wittstock S, et al. (2011) Cooperative function of CCR7 and lymphotoxin in the formation of a lymphoma-permissive niche within murine secondary lymphoid organs. *Blood* 118: 1020-1033.
7. Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, Priddle H, Sancho S, et al. (2002) Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 297: 1031-1034.
8. Mebius RE, Kraal G (2005) Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5: 606-616.
9. Durand CA, Hartvigsen K, Fogelstrand L, Kim S, Iritani S, et al. (2009) Phosphoinositide 3-kinase p110 delta regulates natural antibody production, marginal zone and B-1 B cell function, and autoantibody responses. *J Immunol* 183: 5673-5684.

Supporting figure legends

Figure S1. Distribution of immune cell types from p110 δ ^{WT/WT} and p110 δ ^{D910A/D910A} spleen marginal zone. Histological sections from p110 δ ^{WT/WT} and p110 δ ^{D910A/D910A} spleens were immunofluorescent stained for marginal zone immune cell types. **(A)** MZB (B220⁺ surrounding MOMA⁺ cells around spleen follicles) and MMM (MOMA⁺) ($n = 4$ mice/genotype). **(B)** MZM (SIGNR1⁺) and MMM (MOMA⁺) ($n = 4$ mice/genotype). Bar = 200 μ m.

Figure S2. Immune response in p110 δ ^{WT/WT} mice injected with heat-inactivated *C. albicans*. p110 δ ^{WT/WT} mice received i.p. injections of heat-inactivated *C. albicans* for the indicated times (0, 2, 5, 7, 9 and 21 d) to stimulate an immune response. Total CD4⁺ T cells from p110 δ ^{WT/WT} spleens **(A)** and LN **(B)** were counted before ($t = 0$) and several times after *C. albicans* injection ($n = 6-10$ mice). Mean \pm SD.

Figure S3. Analysis of p110 δ ^{WT/WT} and p110 δ ^{D910A/D910A} lymph node gp38⁺ stromal cell populations. Lymph node sections from p110 δ ^{WT/WT} and p110 δ ^{D910A/D910A} mice were immunofluorescent-stained for gp38⁺ fibroblastic reticular cells from the T cell area ($n = 3$ mice/genotype). Stromal texture was measured using the ImageJ Texture Measure plugin ($p < 0.05$); difference graphs are shown (right).

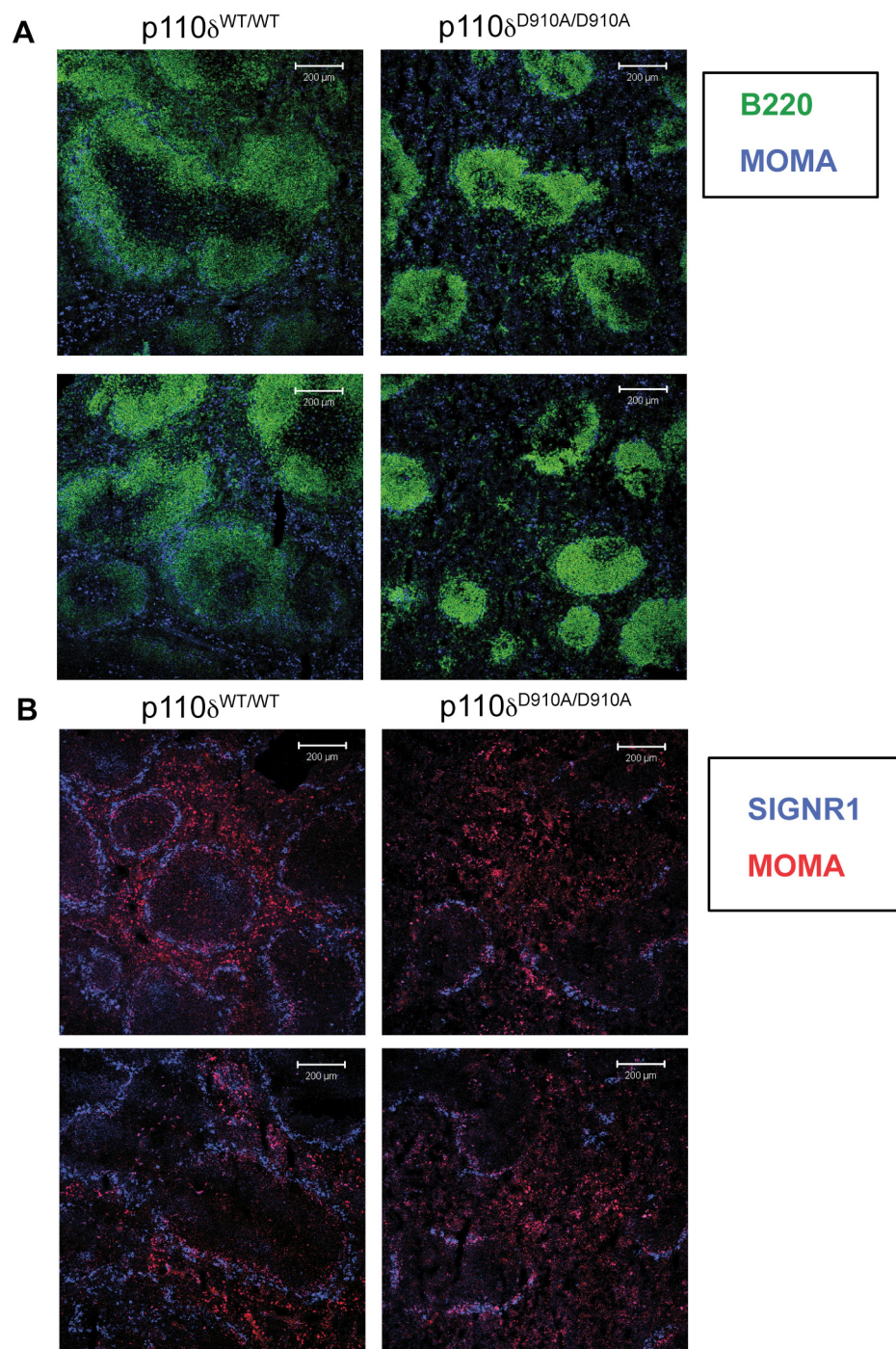


Figure S1

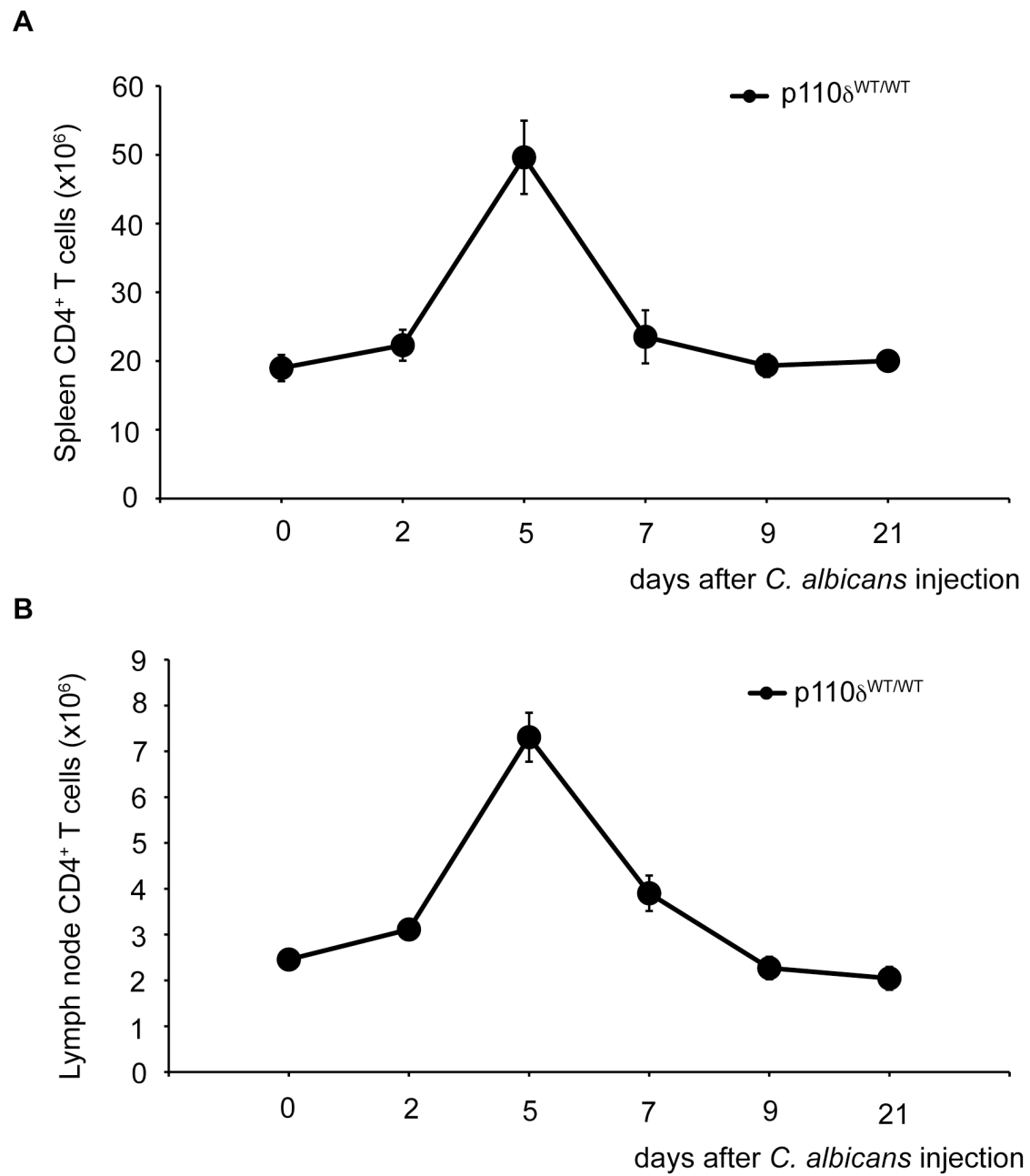


Figure S2

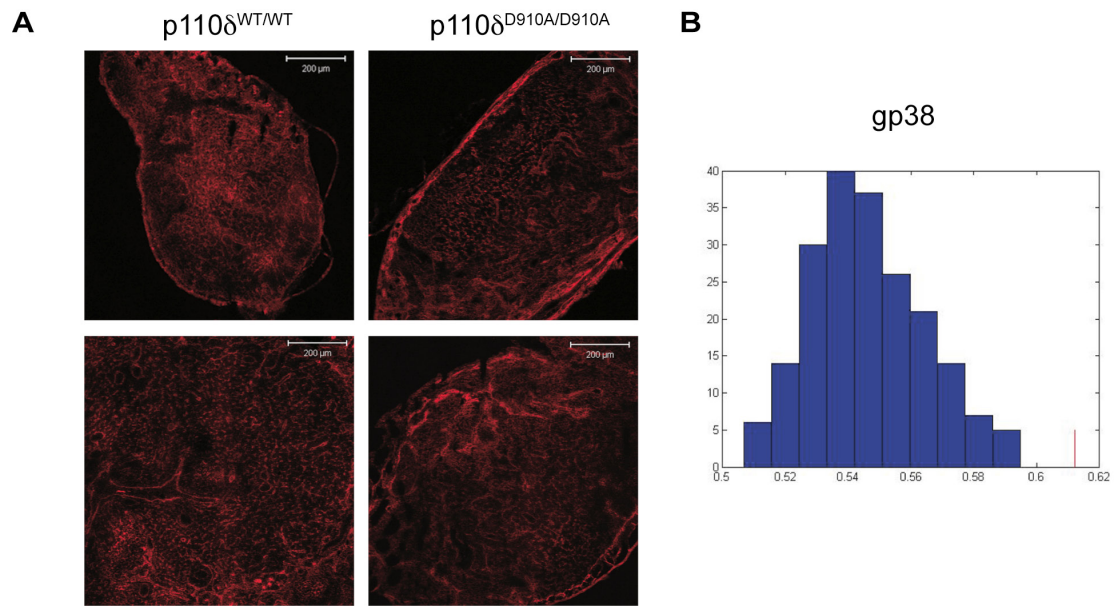


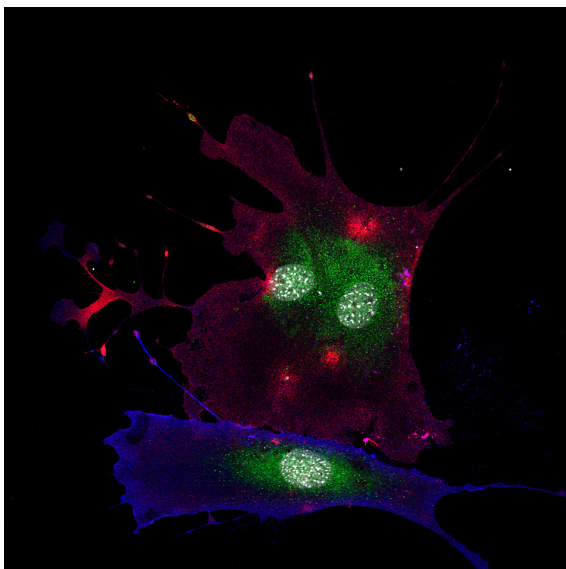
Figure S3

Existe un lenguaje que va más allá de las palabras

Paulo Coelho

El arte es yo, la ciencia es nosotros.

Claude Bernard



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi director de tesis, Domingo, por su apoyo, sus consejos, enseñanzas en lo científico para poder llevar a buen término esta tesis así como por su seguimiento, especialmente en los momentos más críticos del desarrollo de los proyectos que se recogen en este trabajo. Igualmente, agradecer a mi tutora Nila, por su presencia y aliento en la recta final de la escritura de esta tesis, así como por sus comentarios científicos y sugerencias que me han ayudado en la conclusión de este trabajo de investigación.

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros del laboratorio 16, a los que estaban cuando llegué y a los que han ido yendo y viniendo durante mi estancia en el laboratorio. A las ex-domingas Isabela, Cris, Teresita-ita, Irene y Sandra. Gracias especialmente a Isabela, por su paciencia con mis innumerables preguntas, por su compañerismo y su ejemplo de trabajo. Quiero agradecer a Cris su vitalidad contagiosa y su ayuda en mis comienzos con el proyecto de Atero. También al resto de ex-miembros del 16: Ana Franco, Inma, Inma peque, Javi, Ana Risco, Paloma, Fran y Maribel. Especialmente a Ana Franco por estar siempre dispuesta a escuchar y ayudar en lo necesario, a Inma, por compartir risas y temas futboleros y a Ana Risco por sus numerosos detalles.

Por supuesto, quiero agradecer a los compañeros que quedamos en el 16: Sonia, Raquel, Laura, Vladimir, Roberto, Chiara, Esther y María. A Sonia y a Raquel, por enseñarme día a día cómo se trabaja en un laboratorio y cómo funciona el DIO. A Sonia, por su paciencia con los ratones, gracias por los miles de genotipos de todo este tiempo, por compartir tantos momentos todos estos años y por llenar de vida el laboratorio. Gracias a Raquel, por su compañerismo y por hacer que la ciencia sea más llevadera día a día con una gran dosis de humor e ironía. Gracias a Laura por lo fácil que ha sido compartir la poyata sin contratiempos ni malentendidos, da gusto trabajar contigo; a Vladimir, por su disposición para ayudar en cualquier momento y sus innumerables detalles, a Roberto, por introducir, entre su locura y sus pelos, risas, fútbol y waterpolo en el laboratorio, a Chiara, por esa alegría contagiosa día tras día, da gusto venir así a trabajar!, a María, por sus recetas y consejos culinarios y a Esther, por sus consejos, su apoyo y su comprensión en momentos importantes.

Quiero hacer extensivo este agradecimiento a los chicos del 413, (a Abel, Vero, Chechu, Vir, Javi, Vicent, Rosa Varona y a Ana Clara) por sus acertadas sugerencias en los seminarios de grupo y por su ayuda con el mundo de las PI3K, especialmente a Abel, por su disposición para ayudar en cualquier momento y a Vero, por su cercanía y cariño. Del resto del DIO, gracias a María y a Cristina (411); a Cris, a Pilar, a Elena (412) y a Patricia (ex del 412); a Denise y a Pedro (414) (empezamos en la Complu y aquí seguimos); a Manu y a Emilia (415) (por su ayuda con primers, anticuerpos y protocolos); a Laura (siempre sonriente, así da gusto), a Julia (compañera de biblioteca), a Yolanda y a Mario (416), a Gema (417) (siempre atenta y cariñosa) y a David (418) (por su amabilidad

y por su ayuda con la extracción de médula ósea). No quiero pasar sin dar las gracias a Antonio, por su ayuda con los temas de compras, con sentido del humor y cariño; a Cathy, por su paciencia con las correcciones de los manuscritos; a Sara, Almu, Sonia y M^a Carmen, por su ayuda con el apasionante mundo de la Citometría, por las risas que hemos compartido y por hacer más llevaderas las horas interminables de citómetro y análisis. Quiero agradecer también especialmente a Mohi, por sus consejos como amigo y por su disposición para ayudarme en cualquier momento así como todas las vivencias que hemos compartido durante estos años.

Del CNB, también quiero agradecer a Carlos Oscar, por sus aclaratorias clases de estadística y su ayuda con las cuantificaciones y los análisis matemáticos; a Pedro Gallego, por compartir gran parte de nuestra carrera ya desde la Complu; a Miki (que también me acompaña desde la Complu) y a Laura (ex del edificio nuevo), por los ratos en cultivos, por su optimismo y por su gran ayuda con el In Design. Por supuesto a Meriem (B6), siempre sonriente, todo un ejemplo de fortaleza; a las chicas de Microscopía (Sylvia, Susana y Ana); a Lucio, Antonio, Eber e Isa del Animalario; a los atléticos y sanseros del Almacén, sufridores (este año no tanto) pero siempre de buen humor. También a las chicas de la limpieza, Leo (que ya no está) y a los vigilantes y porteros, por su paciencia con las alarmas y por saludar siempre, gestos que hacen que empezar la jornada sea más llevadero.

Querría agradecer también a Vicente Andrés, a José Javier y a M^a Jesús del CNIC, por todo lo que me han enseñado durante nuestra colaboración con su grupo, y por su acogida, cercanía y disposición para ayudar en todo momento.

Gracias a mis amigas biólogas (Miriam, Ana, Paloma, Laura, Barbi, Lore y Lara), gracias por compartir tantas cosas todos estos años desde que empezamos la carrera, incluida la Tesis, suerte a las que estáis en ello!

Gracias a mis Amigos, a Rebe, Sara, Ana Isabel, Anita, Bea, Gabri, Nino, Richi, Juan y Cris. Gracias por estar ahí siempre, por vuestro apoyo constante durante todo el tiempo que ha durado el desarrollo de esta tesis, sin vosotros no habría sido posible.

Gracias también a Carmen y Gabriel, a José, Raquel y a los peques, me habéis apoyado un montón todos estos años. Quiero agradecer también a mis tíos y primos, especialmente a Lupe, por sus consejos desde la experiencia y a la yaya, por estar pendiente del desarrollo de este trabajo desde su comienzo y por su apoyo cariñoso en todo momento.

Esta tesis no habría salido adelante desde luego sin el apoyo de mis padres, Nines y Javier, y de mis hermanos Jara, Javi y Helena. Os estoy profundamente agradecida porque habéis sido mi motor en los momentos de flaqueza y porque, desde el primer momento, habéis confiado en mí. Gracias por inculcarnos desde pequeños el valor del trabajo y del esfuerzo diarios. Gracias a mi madre por ser un verdadero ejemplo de

fortaleza y superación y por su apoyo y cariño constantes. Gracias también a las poetas de la familia por las correcciones de estilo y por las frases para esta tesis, que le aportan un tono más “literario”.

Gracias a Jaco, por su ayuda en el día a día desde que comencé esta tesis, gracias por confiar en mí y por acompañarme en este camino con paciencia, cariño, alegría y viendo siempre el vaso medio lleno en cada momento. Hay igualmente una presencia incipiente y muy próxima a la que quiero dar las gracias porque su compañía tan cercana y el pensamiento de su vida en ciernes (y sus pataditas) ha supuesto en estos últimos meses un punto de apoyo fundamental: si algún día lee este trabajo podrá decir que también ha sido protagonista en parte de las horas dedicadas a esta investigación.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido, de alguna manera, al desarrollo de esta tesis, aunque es posible que olvide en este momento a alguien cuya colaboración ha sido igualmente importante.

